

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

Die polyklonale Aktivierung regulatorischer T-Zellen durch einen CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper reduziert die Arteriosklerose in T_{reg} defizienten ApoEko-Mäusen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carolin Beck, geborene Knoll

aus Berlin

Würzburg, September 2015

Referent: Prof. Dr. med. Georg Ertl
Co-Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2015

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Arteriosklerose.....	1
1.1.1	Aufbau der Gefäßwand	2
1.1.2	Genese arteriosklerotischer Plaques.....	2
1.2	Rolle der Immunabwehr in der Genese arteriosklerotischer Plaques.....	6
1.2.1	CD4+ T-Zellen	8
1.2.2	Regulatorische T-Zellen	13
1.3	Aktuell etablierte Therapieformen gegen Arteriosklerose	20
1.4	Verwendete Antikörper	21
1.5	Ziel der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	25
2.1.2	Antikörper	26
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.4	Technische Geräte	27
2.1.5	Software	28
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Mäuse / Genotypen / Diät	28
2.2.2	Injektionsschemata der Antikörper	29
2.2.3	Organentnahme.....	32
2.2.4	Planimetrie und Imaging: Plaquerfläche	32
2.2.5	FACS-Analyse von Blut und Milz.....	33
2.2.6	Cholesterinanalyse	33
2.3	Statistik.....	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Der CD28 Superagonist D665 amplifiziert signifikant regulatorische T-Zellen (Versuch C).....	35

3.2	Der CD25-spezifische monoklonale Antikörper PC61 reduziert signifikant die T _{reg} -Zahl in ApoEko-Mäusen (Versuch D).....	38
3.3	Die Amplifikation regulatorischer T-Zellen durch den Antikörper D665 hat keinen Einfluss auf die Arterioskleroseentwicklung in „gesunden“ ApoEko-Mäusen (Versuch A)	40
3.3.1	Plauefläche.....	40
3.3.2	Gewicht, Cholesterin und Zellzahlen	41
3.4	Die Amplifikation regulatorischer T-Zellen mit dem CD28 Superagonisten D665 nach initialer T _{reg} -Depletion mit dem Antikörper PC61 führt zu einer signifikanten Reduktion der Plaueentwicklung (Versuch B).....	42
3.4.1	Plauefläche.....	42
3.4.2	FACS-Analyse von Blut und Milz.....	44
3.4.3	Gewicht.....	49
4	Diskussion.....	50
4.1	Rolle regulatorischer T-Zellen in der Arteriosklerose.....	50
4.1.1	Alleinige Stimulation regulatorischer T-Zellen in der naiven ApoEko-Maus zeigt keinen Nutzen bezüglich Arteriosklerose.....	51
4.1.2	Alleinige Suppression regulatorischer T-Zellen führt nicht zur Progression der Arteriosklerose	53
4.1.3	Erfolgreiche Reduktion der Plauefläche durch Stimulation zuvor T _{reg} -depletierter ApoEko-Mäuse.....	55
4.2	Impfung gegen Arteriosklerose?.....	56
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Abkürzungsverzeichnis.....	76
8	Abbildungsverzeichnis.....	77
9	Tabellenverzeichnis.....	78

1 EINLEITUNG

1.1 Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine chronisch-entzündliche Gefäßerkrankung der großen und mittelgroßen Arterien. Bereits 1958 definierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Arteriosklerose wie folgt: Sie „ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima von großen Arterien. Dabei kommt es zur lokalen Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blutprodukten, Bindegewebe und Calciumkomplexen, die mit Veränderungen der Media assoziiert sind.“[1] Durch die lange asymptomatische, aber progrediente Verengung der arteriellen Gefäße durch lipidreiche Ablagerungen an der Gefäßinnenwand zählt sie zu einer der Haupttodesursachen in den Industrienationen. Sie ist grundlegende Ursache einer Reihe von Erkrankungen wie zum Beispiel Koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt, zerebralem Insult und peripher-arterieller Verschlusskrankheit.

2013 betrug die Zahl der Todesfälle in Deutschland 893825 Menschen. Die häufigste Todesursache war mit 39,7% eine Herz-/Kreislaufkrankung, die Mehrheit davon bedingt durch die chronische ischämische Herzkrankheit mit 20.6% und den akuten Myokardinfarkt mit 7%. [2]

Arteriosklerose ist die wichtigste und häufigste krankhafte Veränderung der Arterien mit Verdickung, Verhärtung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung.[3] Die Risikofaktoren für die Entstehung und Progression der Erkrankung sind vielfältig. Hierzu gehören die Hypercholesterinämie (insbesondere erhöhte Low Density Lipoproteine („LDL“)), freie Radikale, Hypertonie, Diabetes Mellitus, Übergewicht, Nikotinabusus, Alter, männliches Geschlecht, Scherkräfte durch Wirbelbildungen im Blutfluss und Infektionen (zum Beispiel mit Chlamydia Pneumoniae, Coxsackievirus B, Zytomegalie).[4] Sie führen zu einer endothelialen Dysfunktion und immunologisch getriggerten, komplexen chronisch entzündlichen Reaktion in der Gefäßwand mit konsekutiver Plaqueentwicklung.[5]

1.1.1 Aufbau der Gefäßwand

Die Gefäßwand wird von drei morphologisch unterscheidbaren Schichten gebildet, der Intima, Media und Adventitia. Die dünne Intima bildet die dem Blutfluss zugewandte Seite. Sie besteht luminal aus einer kontinuierlichen, einzelligen Endothelschicht und wird nach außen durch die innere Lamina Elastica abgegrenzt. Das Endothel hat vielfältige Aufgaben. Es synthetisiert Bindegewebskomponenten und Grundsubstanz, produziert gerinnungshemmende und fibrinolytische, aber auch thrombozytenaggregations- und adhäsionsfördernde Faktoren, setzt endothelrelaxierende und –kontrahierende Faktoren frei, sowie wachstumsregulierende Stoffe. Die Lamina Elastica besteht aus Proteoglykanen und Kollagen (extrazelluläre Bindegewebsmatrix). In der gesunden Intima findet man Makrophagen, CD3+ (Cluster of Differentiation, „CD“), CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sowie vereinzelte glatte Muskelzellen.[6]

Nach extraluminal schließt sich die Media an. Diese wird hauptsächlich von glatten Muskelzellen gebildet. Eine Schicht elastischer Fasern, die externe Lamina Elastica, bildet die Grenze zur äußersten Schicht, der Adventitia. Fibroblasten und glatte Muskelzellen bilden das lockere Bindegewebe der Adventitia. In besonders dicken Gefäßwänden findet man hier zusätzlich kleine Vasa Privata, die die Perfusion der inneren Schichten sicherstellen.[6, 7] Angrenzend an arteriosklerotische Plaques findet sich hier auch häufig tertiäres lymphatisches Gewebe mit B- („B-Zellen“) und T-Lymphozyten („T-Zellen“), Dendritischen Zellen und Makrophagen.[8]

1.1.2 Genese arteriosklerotischer Plaques

Die Erkenntnisse über die Entwicklung arteriosklerotischer Plaques sind bereits weit fortgeschritten. Es gibt verschiedene Hypothesen ihrer Genese, beginnend mit der schon 1977 von Ross formulierten und stetig weiter erforschten Response-to-Injury-Hypothese.[9] Sie postuliert, dass ein Defekt im Epithel der Intima der Beginn einer inflammatorischen und fibroproliferativen Reaktion ist. Abhängig von der Art und Dauer der Verletzung kann diese Reaktion so exzessiv werden, dass ein arteriosklerotischer Krankheitsprozess beginnt.[10] Wie immer genauer erforscht wird, kann man den von Ross beschriebenen „Epitheldefekt“

Einleitung

wohl eher als übergeordneten Begriff verstehen, v.a. aus molekulargenetischer Sicht. Heute sieht man die Arteriosklerose als eine chronisch inflammatorische Erkrankung. Ein T-Zell vermittelter inflammatorischer Prozess bestimmt Wachstum und Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen.[11-13] Die Entzündungsreaktion kann dabei nicht nur Folge des Endotheldefekts sein, sondern auch deren Ursache. Verschiedene Zellen des Immunsystems und spezifische Zytokine wurden mittlerweile in der arteriosklerotischen Plaque nachgewiesen, weshalb der aktuelle Stand der Forschung die Arteriosklerose als ein immuninflammatorisch dominiertes Geschehen bis möglicherweise hin zu Autoimmunprozessen beschreibt.[14]

Erste sichtbare Zeichen der Arteriosklerose sind zum Teil schon im Neugeborenenalter zu erkennen. Zunächst kommt es zu einer komplexen endothelialen Dysfunktion, die unter anderem durch erhöhte Low-Density Lipoprotein-Werte („LDL“) im Blut und freie Radikale ausgelöst wird. Sie ist durch eine verminderte NO-Synthese und verstärkte lokale Oxidation von Lipoproteinen charakterisiert.[5] Bereits oxidierte LDL[15] oder LDL aus dem Blut wandern über das Gefäßendothel in die Intima ein, werden dort oxidiert (oxidierte LDL, „oxLDL“) und unterlaufen weiteren enzymatischen Veränderungen. Dieser oxidative Stress führt neben weiteren Risikofaktoren wie inflammatorischen Prozessen oder hämodynamischem Stress (z.B. im Rahmen einer arteriellen Hypertonie) zu einer Aktivierung des Endothels mit Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1, ICAM-1).[16] Über diese wandern vermehrt Leukozyten, Monozyten und Dendritische Zellen aus dem Blut in die Gefäßwand ein. Monozyten differenzieren sich hier zu Makrophagen. OxLDL wirkt zudem zusätzlich proinflammatorisch, aktiviert Makrophagen und Endothelzellen und ist außerdem ein Autoantigen.[17, 18] 10% der T-Zellen in der arteriosklerotischen Plaque reagieren spezifisch auf oxLDL, was auf eine deutliche Rolle des oxLDL in der Arterioskleroseentwicklung hindeutet. Aber auch andere Faktoren für die Initiation der Arteriosklerose und Endothelaktivierung wie z.B. das Hitze-Schock-Protein 60 („HSP60“) werden als Antigen diskutiert.[15]

Einleitung

Die Monozyten differenzieren sich in der Intima zu Makrophagen und nehmen über Scavenger-Rezeptoren oxLDL-Partikel in Form von Cholesterinestern auf.[5, 19] Diese mit Cholesterin beladenen Makrophagen werden Schaumzellen genannt. Schaumzellen bilden makroskopisch sichtbare, gelblich erscheinende, erhabene und an der luminalen Gefäßwand adhärente Fettstreifen („Fatty streaks“).

Fettstreifen kommen vor allem an hämodynamisch mit Verwirbelungen belasteten Abschnitten der Arterien, wie z.B. Gefäßgabelungen, vor. Prädilektionsstellen sind insbesondere die Aorta und ihre Abgänge (Aa. carotis, Aa. Iliacae, Aa. coronariae) sowie zerebrale Arterien. Bereits in der ersten Lebensdekade kann man Fettstreifen beim Menschen in der Aorta finden, in der zweiten Dekade in den Koronararterien und in der dritten bis vierten in den zerebralen Arterien.[6] Fettstreifen sind im Grunde unter antiatherogener Diät reversible Läsionen, bilden aber in den meisten Fällen die Vorläufer komplexer arteriosklerotischer Plaques.[1]

Dendritische Zellen, eine Form der Antigen-Präsentierenden Zellen, patrouillieren im Blut oder befinden sich lokal in der Gefäßwand. Sie nehmen Antigene wie z.B. LDL-Partikel auf, präsentieren sie T-Zellen in den Sekundären Lymphorganen zur Aktivierung einer Immunantwort und können vermutlich auch direkt vor Ort T-Zellen inhibieren.[8]

Schaumzellen, Makrophagen und Endothelzellen in der Intima sezernieren Zytokine wie IL-1, IL-6, Interferon Gamma („INF γ “), Tumor Nekrose Faktor Alpha („TNF α “) und weitere chemotaktische Faktoren, die gemeinsam zu einer Entzündungsreaktion und Anlockung weiterer Entzündungszellen wie T-Lymphozyten führen. In der Folge kommt es zur Plaqueinitiation und letztendlich zur Plaquestabilisierung.[19] T-Lymphozyten werden auf ihrem Weg in die Plaque aktiviert.[16] Das Verhältnis Makrophagen zu T-Zellen innerhalb der Plaque liegt bei ca. 4:1-10:1.[20]

Makrophagen in der Plaque wiederum sezernieren Wachstumsfaktoren, die glatte Muskelzellen aus der Media einwandern lassen. Die glatten Muskelzellen

Einleitung

können dort ihrerseits proliferieren und sich ebenfalls zu fettreichen Schaumzellen umwandeln. Apoptotische Schaumzellen bilden einen nekrotischen Kern in der Plaque. Zusätzlich kommt es zur Einlagerung von Kalziumkristallen und Bildung von Matrixproteinen.[19] Diese Prozesse führen zu stetigem Plaquewachstum.

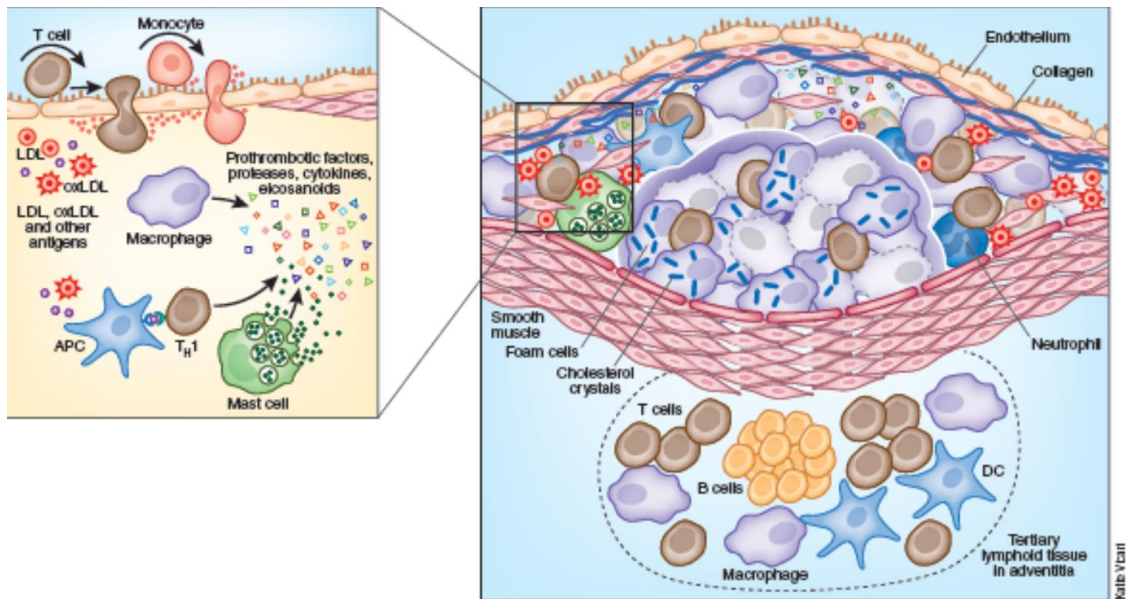


Abb. 1: Schematische Darstellung einer arteriosklerotischen Plaque mit immunologischen Zellen.

Die Plaque besteht im Kern aus Schaumzellen (Fettzellen), Cholesterin-Kristallen, lebenden und apoptotischen Zellen, die fibrotische Kappe aus glatten Muskelzellen und Kollagen. Immunzellen sind in der gesamten Plaque vertreten: T-Zellen, Dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen. Prothrombotische Mediatoren wie Interleukine und Proteasen, Zytokine und Eicosanoide werden von ihnen freigesetzt. Plasmatische Lipoproteine akkumulieren subendothelial. Angrenzend an den Bereich der Adventitia sind weitere immunologische Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen) zu finden. (Entnommen aus Hansson et al. 2011,[8] gedruckt mit Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd, Nature Immunology, „The immunessystem in atherosclerosis“ Copyright 2011)

Zum Gefäßlumen wird die arteriosklerotische Plaque von einer antiatherogenen fibrösen Kappe begrenzt. Hier findet man prozentual die meisten T-Lymphozyten in der Plaque des Menschen.[12] Kommt es nun zu einer Ruptur dieser Kappe, liegen atherogene Strukturen frei, an die sich Thrombozyten anlagern, die zu einer weiteren Gefäßverengung bis hin zum völligen Verschluss des Gefäßes führen oder abreißen und als Embolus periphere Arterien verlegen.

Einleitung

Viele Modelle beschreiben außerdem, dass die Arteriosklerose durch chronische Infektionen mit zum Beispiel Chlamydia Pneumoniae, Helicobacter Pylori oder Mycobacterium Tuberculosis und Immunisierung mit Proteinen wie dem Hitzeschockprotein 60/65 (HSP60/65) verstärkt wird.[21-23]

1.2 Rolle der Immunabwehr in der Genese arteriosklerotischer Plaques

Der vorherrschende Prozess in der Entstehung und Progression der Arteriosklerose ist wie oben beschrieben eine Entzündungsreaktion, vermittelt durch das körpereigene Immunsystem. Dieses lässt sich gliedern in ein angeborenes und ein erworbenes (adaptives) Immunsystem.

Vermittler der angeborenen Immunität reagieren sofort und Antigen-unspezifisch auf fremde Erreger. Sie stellen die erste Phase des Abwehrsystems des Körpers und besitzen kein immunologisches Gedächtnis. Hierzu gehören zellvermittelte Prozesse durch Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie humorale Komponenten wie das Komplementsystem, Akute Phase Proteine und Interferone. Auch Zytokine und Eikosanoide sowie chemische Barrieren des Körpers können zur angeborenen Immunität gezählt werden.[24, 25]

Im Rahmen der chronischen Entzündung während der Genese arteriosklerotischer Plaques kommt es zu einer zunehmenden Migration von Leukozyten in die und Proliferation innerhalb der Gefäßwand.[26, 27] Dominierend sind vor allem Makrophagen.[26] Während des Zusammenspiels der angeborenen und erworbenen Immunität ist eine Vielzahl von Zytokinen nachweisbar.

Das erworbene Immunsystem bekämpft zeitlich verzögert aber hoch pathogen- und antigenspezifisch als fremd erkannte Moleküle, so genannte Antigene. Es kann zwischen Fremd- und Selbstantigen unterscheiden. Zum erworbenen zellulären Immunsystem gehören B- und T-Lymphozyten. Sie entstammen der gleichen Vorläuferzelle im Knochenmark, werden aber im Knochenmark (B steht für „bonemarrow“) bzw. Thymus (T steht für Thymus) geprägt und erlangen dadurch unterschiedliche immunologische Fähigkeiten. Antigen-präsentierende

Einleitung

Zellen (z.B. Makrophagen) nehmen Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren Fragmente an ihrer Oberfläche mit Hilfe von spezifischen Membranproteinen, die im Major Histocompatibility Complex (MHC) kodiert sind.[24, 25] Über diese MHC Moleküle präsentieren sie zelleigene und zellfremde Peptidfragmente auf ihrer Oberfläche. MHC I-kodierte Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen, MHC II-kodierte Moleküle auf Antigenpräsentierenden Zellen (z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen).

Von den zirkulierenden Lymphozyten sind etwa 10% B-Lymphozyten. Lösliche, fremde Antigene werden von ihnen aufgenommen, verarbeitet und Antigen-Bestandteile über MHC der Klasse II („MHC II“) präsentiert. Durch Mitwirkung von T-Helferzellen und dem von ihnen ausgeschütteten Interleukin 4 („IL-4“) kommt es zu einer klonalen Expansion der B-Lymphozyten und Umwandlung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Sie sind außerdem in der Lage, als Gedächtniszellen zu persistieren. Bei Reinfektion mit demselben Antigen können sie schnell und spezifisch mit der passenden Antikörperproduktion reagieren. Phänotypisch lassen sie sich durch die Oberflächenmarker CD19 und CD21 sowie MHC II charakterisieren. CD steht für „Cluster of Differentiation“, und stellt Gruppen von immunphänotypischen Oberflächenmarkern von Zellen dar. Meistens sind diese CDs membrangebundene Glykoproteine mit Rezeptor- oder Signalfunktion.

T-Lymphozyten stellen etwa 70% der im Blut zirkulierenden Lymphozyten. Sie patrouillieren im Blut durch den Körper und untersuchen nach Eintritt in ein Gewebe körpereigene Zellen auf Infektionen oder zelluläre Defekte. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und der Abwehr einer Reihe von Infektionen, wie zum Beispiel durch Viren, Pilze und Mykobakterien, aber auch bei der Tumorabwehr, Transplantationsimmunität und Allergie vom verzögerten Typ. T-Lymphozyten erkennen Antigene nur zellvermittelt über einen Proteinkomplex in ihrer Plasmamembran, den T-Zellrezeptor („TCR“), über welchen sie mit den MHCs der körpereigenen Zellen in Kontakt treten.

Einleitung

Eine Gemeinsamkeit aller T-Lymphozyten ist das Membranprotein CD3. Es ist Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Über CD3 können T-Zellen im Allgemeinen mittels immunhistochemischer Verfahren identifiziert werden. Anhand weiterer Oberflächenmarker (s.u.) können die einzelnen Subpopulationen unterschieden werden. In der gesamten arteriosklerotischen Plaque können T-Lymphozyten nachgewiesen werden.[8, 12]

T-Zellen lassen sich ausserdem untergliedern in CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten. Zytotoxische T-Zellen können mit ihrem spezifischen Co-Rezeptor CD8 die MHC Moleküle der Klasse I („MHC I“) binden, die von allen körpereigenen Zellen produziert werden. Präsentiert eine körpereigene Zelle ein passendes „fremdes“ Antigen, kann die zytotoxische T-Zelle direkt die infizierte oder maligne entartete Zellen abtöten.[24, 28]

1.2.1 CD4+ T-Zellen

Sie interagieren über ihren TCR und den Co-Rezeptor CD4 mit MHC Molekülen der Klasse II („MHC II“) an der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen („APC“) (dazu gehören Makrophagen, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen). Damit die Immunantwort naiver T-Zellen initiiert werden kann, sind noch weitere Zell-Interaktionen nötig. APC exprimieren B7.1-Proteine (CD80), dies vor allem nach Kontakt mit Antigenen. Diese B7-Proteine werden vom Costimulator CD28 erkannt. CD28 kommt auf nahezu allen T-Zellen vor. Die Signale der Interaktion von CD28 und B7.1 sowie die der Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit MHC II Protein und dem Co-Rezeptor CD4 sind nötig, um die T-Zelle zu aktivieren. Fehlt eine dieser Interaktionen, bleibt die T-Zelle inaktiviert. Eine antigen-stimulierte T-Zelle exprimiert außerdem den Liganden CD40L, der an CD40 auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen bindet. Dies führt zu noch mehr B7.1 Costimulation und zu Sekretion von IL-12, was zu verstärkter T-Zell-Differenzierung führt. Die aktivierte T-Zelle wird T-Effektorzelle (T_{eff}) genannt.

Den Hauptanteil der CD4+ T-Zellen bilden T-Helferzellen („ T_H “). Sie sind entscheidende Vermittler der Immunabwehr und des Entzündungsgeschehens. Naive CD4+ T-Zellen können sich je nach vorherrschenden Signalen zu T-

Einleitung

Helferzellen der Subgruppe 1 („T_{H1}“), -2 („T_{H2}“) oder -17 („T_{H17}“) oder zu regulatorischen T-Zellen („T_{reg}“) entwickeln.[29, 30] Diese Zellen inhibieren sich gegenseitig. T_{H1}-Zellen richten sich vor allem gegen intrazelluläre Bakterien oder Parasiten, indem sie Makrophagen aktivieren.[31] T_{H2}-Zellen induzieren hingegen die Antikörperproduktion durch B-Zellen, um extrazelluläre Toxine und Erreger zu bekämpfen.[30] T_{H17}-Zellen lenken die Immunantwort vor allem gegen mikrobielle Erreger, insbesondere extrazelluläre Bakterien und Pilze.[32, 33] T_{reg} supprimieren unterschiedlichste Zellgruppen, um pathogene und autoimmune Immunreaktionen zu hemmen.[34]

Für die Differenzierung der T-Zellen sind verschiedene Zytokine notwendig: INF γ und IL-12 für die T_{H1}-Zell-Differenzierung,[31] IL-4 und IL-2 für die T_{H2}-Zell-Differenzierung.[35, 36] Diese Zytokine instruieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen, ihre jeweiligen zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren zu exprimieren. Die Expansion der jeweiligen Zellgruppen wird induziert durch IL-12 für T_{H1}, IL-2 für T_{H2} und TGF β für T_{reg}. [29] [37]

T_{H1}-Zellen schütten Zytokine wie INF γ , TNF α und IL-2 aus.[38] Sie aktivieren damit die zelluläre Immunantwort und wirken direkt im arteriosklerotischen Plaquegeschehen, indem sie weitere Makrophagen, glatte Muskelzellen und endotheliale Zellen zur Zytokinausschüttung aktivieren.[39-42] Sie wirken proinflammatorisch und führen so vermutlich zu einer verstärkten Arteriosklerosebildung.[17] Insbesondere das T_{H1}-Zytokin INF γ wirkt proinflammatorisch und atherogen.[43, 44] Durch Inhibition der glatten Muskelzellen und Collagen Synthese führt INF γ außerdem zu einer Destabilisierung der Plaque.[45] T_{H1}-Zellen sind die vorherrschende T_H-Untergruppe in der Plaque, ihre Zytokine weisen hier vor allem in frühen Läsionen ein hohes Expressionsmuster auf, während Zytokine der T_{H2}-Zellen nur in kleinen Mengen nachweisbar sind.[45] Vor allem erhöhte INF γ -Konzentrationen können in der Plaque gemessen werden, ein Indikator für vermehrtes Vorhandensein von T_{H1}-Zellen.[46, 47]

T_{H2}-Zellen wirken eher atheroprotektiv und lenken die Immunantwort u.a. über TNF β , IL-4 und -10 in Richtung der humoralen Immunantwort, also zur

Einleitung

Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten. IL-10 wirkt atheroprotektiv.[17] T_H1- und T_H2-Zellen inhibieren sich gegenseitig.[42, 45]

Ait-Oufella et al. beschreiben aber 2009 auch eine mögliche atherogene Wirkung der T_H2-Zellen.[44] Weiterhin war bei King et al. ein Mangel des T_H2-Zytokins IL-4 mit einer verminderten Arteriosklerose assoziiert.[48] In der Arteriosklerose scheinen aber die T_H1-Wirkungen als atherogener Part zu überwiegen.

Veillard et al.[49] erforschten ausführlich das Verhalten von Entzündungszellen, ihren Zytokinen und Chemokinen in der Pathogenese der Arteriosklerose. Makrophagen und CD4⁺ T-Lymphozyten konnten sie nach zwei Wochen atherogener Diät in der Plaque nachweisen. Es folgte eine steigende Expression proinflammatorischer Zytokine ab Woche vier. Gleichzeitig gelang der Nachweis einer Zunahme von antiinflammatorischen T_{reg} und T_H2-Zellen und ihrer Zytokine in der Läsion. Es folgte eine Zunahme der eher atherogenen T_H1-Zellen bei konstanten T_{reg} und T_H2-Zellen, später ab Woche zehn ein Abfall der eher atheroprotektiven T_H2-Zellen. Nach zehn bis vierzehn Wochen konnte keine weitere Zunahme der Entzündungsmediatoren festgestellt werden, bei aber weiter progredienten Läsionsflächen. Veillard et al. deuteten die Erkenntnisse als Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren, mit Überwiegen der proinflammatorischen Zytokine.[49]

Nilsson et al. beschreiben in ihrem Review die mögliche Rolle der Immunabwehr in der Arteriosklerose folgendermaßen: Antigen-präsentierende Zellen präsentieren CD4⁺ T-Zellen Antigene wie zum Beispiel oxLDL oder andere Autoantigene. Je nach vorliegendem Zytokinmilieu und costimulatorischen Molekülen differenzieren sich die CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-, T_H2- oder T_{reg}-Zellen. T_H1-Zellen führen zu einer oben beschriebenen Entzündungsreaktion und Progression der Erkrankung, T_H2-Zellen zur Aktivierung Antigen-spezifischer B-Zellen. Die von ihnen produzierten Immunglobuline können oxLDL binden und eine Progression der Arteriosklerose vermindern. Kommt es zur Bildung von regulatorischen T-Zellen, dann steht die Ausbildung einer immunologischen Toleranz im Vordergrund. Diese hemmen T_H1- und T_H2-Zellen und reduzieren die Entzündungsreaktion.[50]

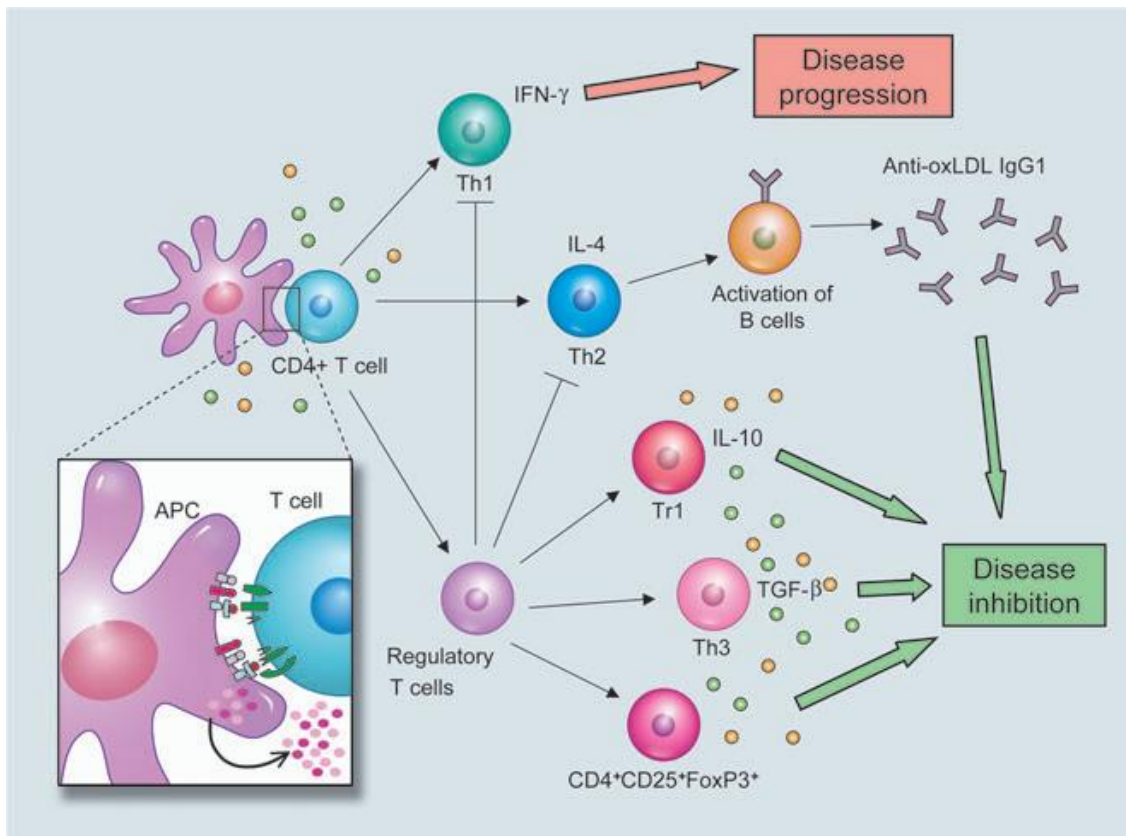


Abb. 2: Möglicher Ablauf einer regulatorischen Immunreaktion

Antigen-präsentierende Zellen (APC) präsentieren T-Zellen oxidierte LDL (oxLDL) und andere Autoantigene. Je nach Art der costimulatorischen Moleküle und Zytokine wird die weitere Entwicklung der antigenerkennenden CD4+ T-Zellen beeinflusst. Eine Differenzierung in T_H1 -Zellen resultiert in der Aktivierung von Entzündungsreaktionen und Fortschreiten der Erkrankung, während die Differenzierung zu T_H2 -Zellen zur Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen führt. Diese produzieren IgG, welches helfen könnte, oxLDL zu beseitigen und so eine Progression der Krankheit zu vermindern. Führt die Antigenpräsentation zur Bildung regulatorischer T-Zellen, kommt es zu einer Toleranzentstehung vermittelt durch IL-10-sekretierende T_{reg1} , TGF β -sekretierende T_H3 und nT_{reg} . Die Folge ist eine reduzierte Entzündungsreaktion und ein verminderter Krankheitsprogress durch Inhibition der T_H1 - und T_H2 -Zellen. (übernommen aus Nilsson et al. 2009,[50] gedruckt mit Genehmigung von John Wiley and Sons, Journal of Internal Medicine, „Vaccines modulation lipoprotein autoimmunity as a future possible therapy for cardiovascular disease“ Copyright 2009)

Interaktion von T-Zellen und Dendritischen Zellen

T-Zellen sowie auch Dendritische Zellen („dendritic cells“ kurz: „DC“) sind mitverantwortlich für die Immunabwehr und für Toleranz gegen Selbst- und Fremdartigene. DC zirkulieren in verschiedensten Organen, nehmen dort Fremd- und Selbstantigene auf und präsentieren sie in den Lymphatischen Organen den Lymphozyten. Unreife Lymphozyten, die stark mit diesen Selbst-Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen reagieren, sterben normalerweise

Einleitung

ab bevor sie weiter reifen (negative Selektion). Je nach Aktivierungsgrad der DC führen sie bei Fremdantigenen zur Aktivierung spezifischer T-Zellen oder bei Selbstantigenen zu Anergie oder zur Bildung regulatorischer T-Lymphozyten (s.u.) für eine Toleranzentstehung. Im Rahmen der zentralen Toleranz unterlaufen selbstreaktive T-Lymphozyten im Thymus nach Bindung an DCs und mTECs (medullary thymic epithelial cells) eine negative Selektion und werden deletiert. Außerdem können regulatorische T-Zellen für den Einsatz in der Peripherie gebildet werden. Die periphere Toleranz führt zu Anergie oder Suppression autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie durch Bindung an DC oder durch T-Zell-T-Zell-Interaktion sowie zur Bildung von regulatorischen T-Zellen, die ihrerseits autoreaktive T-Zellen supprimieren.[51, 52]

In der Genese der arteriosklerotischen Plaque spielen T-Lymphozyten[53-57] und insbesondere die Interaktion von DC und T-Zellen eine zentrale Rolle. In instabilen menschlichen Plaques (akutes Koronarsyndrom) findet man eine 10-fache Zunahme der CD3+ T-Zellen mittels PCR im Vergleich zu stabilen Plaques (stabile Angina Pectoris).[58] Dendritische Zellen finden sich mehr in arteriosklerose-prädisponierten gesunden menschlichen Gefäßanteilen als in arteriosklerose-resistenten Bereichen[59, 60] sowie in der arteriosklerotischen Adventitia. Fortgeschrittene arteriosklerotische Plaques haben eine höhere Zahl von DC. Shaposhnik et al zeigten, dass eine verminderte Zahl an DC mit einer Verbesserung der Arteriosklerose einhergeht,[61] während andere Studien zeigten, dass eine reduzierte Anzahl von DC mit einer schwereren Arteriosklerose einhergeht und DC eine atheroprotektive Rolle spielen indem sie die T_{reg} Homöostase regulieren.[60]

Dendritische Zellen präsentieren arteriosklerotische „Selbst-Antigene“ den naiven T-Zellen, die sich dann differenzieren und proliferieren. Einige der dendritischen Zellen können zum Beispiel atheroprotektiv wirken wenn sie zuvor mit entsprechenden atheroprotektiven Antigenen in Kontakt kamen. Diese DC können dann spezifische regulatorische T-Zellen induzieren. Diese T_{reg} supprimieren proinflammatorische T-Effektorzellen, T_{H1} und T_{H17}-Zellen und können die immunstimulatorische Wirkung der DC hemmen.[62] Je

fortgeschrittener der arteriosklerotische Prozess ist, desto mehr DC befinden sich in der Plaque[63] und je mehr DC aktiviert sind, desto mehr nehmen sie Antigene unterschiedlichster Art auf und präsentieren sie entweder direkt vor Ort den T-Zellen oder wandern zu den sekundären Lymphorganen, wo sie ebenfalls T-Zellen antigenspezifisch aktivieren. Auch können sie T-Zellen in die Plaque locken und deren Funktion mittels verschiedener Zytokine modifizieren.[60] Zusätzlich produzieren sie aber auch Proteasen, die zu einer zunehmenden Instabilität der Plaque führen.[64] Vermutlich führt eine zu hohe DC-Aktivität zu einer verstärkten lokalen Immunreaktion mit Verlust der Toleranzfähigkeit.[65] Im Resümee induzieren die DC auf der einen Seite über T-Zell Interaktionen eine Progression der Arteriosklerose mit zunehmender Plaqueinstabilität,[64] auf der anderen Seite können sie aber auch eine Toleranz gegen Autoantigene vermitteln und zur Expansion regulatorischer T-Zellen führen, und damit atheroprotektiv wirken.[66]

1.2.2 Regulatorische T-Zellen

Der Körper von Säugetieren hat Techniken entwickelt, um sich eine immunologische Toleranz gegen körpereigene Antigene aufzubauen, Immunantworten gegen körperfremde zu begrenzen und die Lymphozyten Homöostase aufrecht zu erhalten.[29] 1970 stellten Gershon und Kondo erstmals fest, dass einige T-Zellen Immunreaktionen nicht nur verstärken sondern auch vermindern können.[67] In den folgenden Jahren wurden verschiedene T-Zelltypen gefunden, die immunsupprimierende Fähigkeiten haben. Man kann sie unterteilen in induzierte regulatorische T-Zellen („iT_{reg}“) und natürliche T_{reg} („nT_{reg}“). Induzierte T_{reg} werden in der Peripherie durch spezielle Antigenstimulation aus T-Zell Populationen induziert. Zu ihnen gehören unter anderem IL-10 produzierende regulatorische T-Zellen des Typ 1 („Tr1“),[68] CD4⁺CD25⁺ T_{reg}, die in der Peripherie nach Konversion aus Gedächtniszellen entstehen[69] und TGFβ produzierende T_H3-Zellen.[34] Durch zum Beispiel TGFβ-Stimulation können naive CD4⁺ T-Zellen zu iT_{reg} in der Peripherie konvertiert werden.[37, 70-72] Natürliche regulatorische T-Zellen werden im Thymus bereits als funktionsfähige regulatorische T-Zellen gebildet und machen etwa 5-10% der menschlichen und murinen CD4⁺ T-Zellen aus.[34] Sie wurden

Einleitung

in den 1990er Jahren durch Shimon Sakaguchi entdeckt.[73] Sie sind spezifisch für körpereigene Antigene und deshalb insbesondere für die Verhinderung von Autoimmunität essentiell.

Identifikation der T_{reg}

Die Mehrzahl der T_{reg} trägt die Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie den intrazellulären Marker FoxP3 und kann mittels FACS-Analysen oder Färbungen gut identifiziert werden. CD4 ist der charakteristische Marker der MHC II restringierten T-Zellen. Forkhead Box Protein 3 („FoxP3“) ist ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor.[74] Er wurde als wichtigster Regulator für die Entwicklung und Funktion der nT_{reg} identifiziert.[75-77] Die Expression des CD25+ Rezeptors, eine IL-2 α -Rezeptorkette, ist vermutlich auf die Abstammung vom Thymus zurückzuführen.[78, 79] Außerdem ist sie im Allgemeinen ein Zeichen für die gesteigerte Aktivität einer T-Zelle. T_{reg} können aber dadurch identifiziert werden, dass sie CD25 konstitutiv in großen Mengen exprimieren („CD25^{high}“), während konventionelle CD4+ T-Zellen CD25 nur transient und niedrige Level exprimieren.[80, 81] Weitere T_{reg}-typische Marker sind CTLA-4 („cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4“), GITR („glucocorticoid induced tumor necrosis factor“), LAG-3 („lymphocyte activation gene 3“) sowie eine niedrige CD127-Expression. Miyara et al. unterteilen menschliche FOXP3+ Zellen in weitere Klassen: CD45RA⁺FOXP3^{low} (ruhende T_{reg}), CD45RA⁻FOXP3^{hi} (aktivierte T_{reg}) und CD45RA⁻FOXP3^{low} (nicht-suppressorische Zellen).[82]

Allerdings wird kontrovers diskutiert, wie sicher sich T_{reg} von anderen T-Zellen anhand der Marker als eigenständige Zellgruppe abgrenzen lassen. Corthay postulierte, dass jeder der genannten Marker auch ein Zeichen für eine gesteigerte Aktivität von T-Zellen allgemein sein könnte und stellte in Frage, ob T_{reg} tatsächlich als eigenständige Unterform der T-Zellen zu sehen sind oder ob bereits bekannte T-Zellformen je nach Zytokinmilieu in einen suppressorischen Phänotyp konvertieren.[83] Beyersdorf et al. und Lin et al. hingegen zeigten mittels Fluoreszenzfärbung, dass durch T_{reg}-Stimulation vermittelt durch einen CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper sowohl CD4+CD25- als auch CD4+CD25+ T-Zellen proliferieren, ihr Phänotyp aber

Einleitung

gleich bleibt. Sie vermuteten, dass die Erhöhung der Zellzahl und Aktivität der T_{reg} durch Aktivierung bereits vorher bestehender T_{reg} induziert wird und nicht durch CD25-Induktion.[84, 85] Versuche von Betelli et al. zeigten, dass 50-100% der CD25-FoxP3- T-Zellen durch TGF β -Stimulation und Costimulation FoxP3 exprimieren[86] und Untersuchungen von Wan et al., dass eine verminderte FoxP3-Expression die Suppressionseigenschaften der T_{reg} vermindert und zu einer Umwandlung in T-Effektorzellen (vornehmlich T_H2 -Zellen) führt.[87] Teilweise scheint demnach eine Konversion von T-Effektorzellen zu regulatorischen T-Zellen mit suppressorischer Aktivität und umgekehrt möglich. Gemeinsamer Konsens ist aber, dass CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen regulatorische und supprimierende Fähigkeiten haben – unabhängig davon, ob sie als eigenständige Zellgruppe oder durch Induktion aus anderen T-Zellen entstanden sind.

Da spezifischere Marker für T_{reg} bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt sind, werden T_{reg} in den meisten Studien durch die Kombination der Marker CD4+CD25+FoxP3+ charakterisiert und identifiziert. Diese Marker lassen sich gut mittels Fluoreszenzfärbung und Durchflußzytometrie erkennen, unterscheiden aber nicht die verschiedenen Treg-Subgruppen. In der Peripherie von Mäusen sind 15% der CD4+ T-Zellen FoxP3+, 70-80% der FoxP3+CD4+ T-Zellen zudem CD25+. Die restlichen sind CD25-. Im Thymus sind ca. 5% der CD4+CD8- reifen Thymozyten FoxP3+, von diesen 70% zusätzlich CD25+.[88] Alle diese Zellen in Thymus und Peripherie sind zudem GITR^{high}. [89]

Rolle der T_{reg} im Körper

T_{reg} erhalten die immunologische Homöostase des Körpers[90] und sind an der Kontrolle immunologischer Reaktionen wie Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen maßgeblich beteiligt.[34] In der Erhaltung der immunologischen Selbst-Toleranz und dem Schutz gegen Autoimmunerkrankungen spielen T_{reg} eine Schlüsselrolle,[73] da sie autoreaktive T-Zellen kontrollieren.[91] Eine Reduktion der Anzahl oder Funktionalität der T_{reg} induziert Autoimmunerkrankungen. 2001 konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie dem IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked Syndrome) und autoimmune Scurfy Mäuse Mutationen im FoxP3-Gen haben.[92] Auch in der Suppression von Allergien und Asthma,[93] der Toleranz gegen diätetische Antigene,[94, 95] der immunologischen Toleranz zwischen Mutter und Fötus[96] und der Suppression pathologischer Immunreaktionen[97] spielen T_{reg} eine wichtige Rolle. Eine komplette Depletion der T_{reg} aktiviert schwache oder autoreaktive T-Zell-Klone, die schwere, ausgedehnte autoimmune und inflammatorische Erkrankungen induzieren.[88] Eine Erhöhung der T_{reg}-Zahl oder Erhöhung ihrer suppressiven Funktion zeigt einen positiven Einfluss auf Autoimmunerkrankungen. Durch Expansion regulatorischer T-Zellen kann die periphere Toleranz wieder hergestellt werden und z.B. verschiedene Autoimmunerkrankungen (experimentelle Autoimmunencephalomyelitis, experimentelle Autoimmunneuritis, adjuvante Arthritis) klinisch präventiv und therapeutisch im Tiermodell gebessert werden.[98, 99] Dass T_{reg} auch im Rahmen der Transplantationsimmunität wirken, zeigen Versuche, in denen durch T_{reg}-Stimulation die akute und chronische Allograft-Abstoßung verhindert wird.[37, 72, 100, 101] Regulatorische T-Zellen wirken zudem im Rahmen der Tumorimmunität.[71]

Auch im arteriosklerotischen Plaquegeschehen spielen T_{reg} eine entscheidende Rolle. Dies belegte erstmals Jonasson 1986,[54] unterstützt durch stetig weiter wachsende Erkenntnisse.[53-56] Aktivierte T-Zellen befinden sich in der Plaque[17, 18, 53, 54, 102] und zeigen klonale Expansionen, was eine zellvermittelte Immunreaktion in der Plaque wahrscheinlich macht.[53, 103]

Einleitung

CD4⁺ T_H1-Helferzellen stellen die vorherrschende T-Zell-Subpopulation in der Plaque.[45] Das von den T_H1-Zellen ausgeschüttete Zytokin INF γ wirkt proinflammatorisch und proatherogen. Durch Makrophagenaktivierung und Inhibition der Proliferation der glatten Muskelzellen und der Kollagensynthese führt es außerdem zur Plaquestabilisierung. T_H2-Zellen hingegen scheinen diese proatherogenen Effekte der T_H1-Zellen zu antagonisieren, wirken daher atheroprotektiv.[45] Sie machen aber nur eine Minderheit der Zellen in der Läsion aus.[17, 45] Regulatorische T-Zellen wirken atheroprotektiv, vermutlich indem sie T_H1-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen inhibieren.[104]. Diese Inhibition kann durch direkte Zellkontakte sowie durch Zytokin-Sekretion vermittelt werden. Der genaue Mechanismus wird noch kontrovers diskutiert. Aktuelle Studien von verschiedenen Gruppen zeigen, dass Untergruppen von regulatorischen T-Zellen aktiv die immunologische Toleranz verändern und die Entwicklung oder Progression der Arteriosklerose durch Herunterregulation von Effektor T-Zellen inhibieren.[105]

Seit langem wird erforscht, ob und wie man die Arteriosklerose therapieren kann. Die Erkenntnis, dass hier inflammatorische und autoimmunologische Prozesse vorliegen und bestimmte Zellreihen wichtige Rollen spielen, lässt nach neuen Interaktions- und Therapiemöglichkeiten suchen. 2006 konnten Ait-Oufella et al. als erste zeigen, dass der Transfer von Wildtyp-Splenozyten sowie von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen in T_{reg}-defiziente Mäuse eine signifikante Verminderung der Plaquesfläche induziert.[39] Es folgte unter anderen 2007 eine Publikation von Mor et al., die erneut den atheroprotektiven Effekt der T_{reg} belegte. Zu Arteriosklerose neigende ApoEko-Mäuse wiesen quantitativ weniger T_{reg} in Milz, Thymus und Lymphknoten auf als Wildtyp-Mäuse. Alte ApoEko-Mäuse wiesen weniger T_{reg} auf als junge Tiere des gleichen Genotyps. Weiterhin war auch die suppressive Aktivität der T_{reg} in ApoEko-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermindert. T_{reg}-Transfer in ApoEko-Mäuse führte zu einer signifikanten Abschwächung der Arteriosklerose im Vergleich zum Transfer von CD4⁺CD25⁻ Zellen und zu einer stabileren Zusammensetzung der Plaques.[106]

Einleitung

Klingenberg et al. demonstrierten 2009, dass eine selektive Depletion von FoxP3+ T_{reg} die Arteriosklerose signifikant verschlimmert [107] und Mallat et al. wiesen im gleichen Jahr eine Reduktion arteriosklerotischer Läsionen nach Transfer regulatorischer T-Zellen in ApoEko-Mäuse nach.[108]

FoxP3+ T-Zellen können v.a. in Lymphknoten und Milzen gesunder Mäuse nachgewiesen werden, aber auch frei im Blut. Histologische Studien an arteriosklerotischen Plaques des Menschen zeigen CD3+-T-Lymphozyten in steigender Anzahl mit fortschreitender Plaqueentwicklung.[58] In Versuchen von De Boer et al. jedoch beträgt der Anteil der FoxP3+ T_{reg} an den CD3+-T-Lymphozyten in allen Stadien nur 0,5-5%. Allerdings verdoppelt sich im Verhältnis die Zahl der T_{reg} von 1,9% auf 3,8% im Vergleich von Low-Risk- zu High-Risk-Plaques.[109] Zum Vergleich findet man in normaler Haut 24% bzw. in entzündeter Haut 28% FoxP3+ T_{reg} (15% Zuwachs).[39] Bei Menschen mit Koronarer Herzerkrankung konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Multigefäßerkrankung weniger CD4+CD25+CD127- T_{reg} im Blut haben als Patienten mit nur einem betroffenen Gefäß.[110]

Wichtige Zytokine für die Funktion der T_{reg}

Maßgeblich beteiligt an der Regulation des intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3 ist TGFβ. Das Zytokin induziert die FoxP3-Expression der T_{reg}, spielt eine Hauptrolle in der Differenzierung der iT_{reg} und ist wichtig für die nT_{reg} Entwicklung.[111-113] Je nach Aktivierungsgrad können T_{reg} auf ihrer Oberfläche TGFβ1 exprimieren und über Zell-Kontakte hemmen oder TGFβ frei sezernieren.[114-116] Auch nach der Ausdifferenzierung ist TGFβ für das Überleben und die Funktionstüchtigkeit der T_{reg} wichtig. 50-100% der CD25-FoxP3- Zellen können durch TGFβ und Costimulation FoxP3 exprimieren[86] und konventionelle T-Zellen können durch FoxP3-Überexpression in einen T_{reg}-Phänotyp konvertieren und suppressive Aktivität erlangen.[75] Solche zum Beispiel TGFβ-induzierten murinen FoxP3+ T-Zellen erlangen in vitro und vivo suppressive und regulatorische Aktivität.[80] T_{reg} können also vermutlich aus einem T-Zell-Pool induziert werden und die T-Zell-Untergruppen durch Zytokinwirkungen ineinander übergehen. Ihre Wirkung auf

Einleitung

das Plaquegeschehen können sie demnach lokal ausüben, aber auch von peripher steuern. T_{reg} sind nötig, um die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunität zu steuern. $TGF\beta$ ist wichtig[113] aber nicht essentiell[87] für die suppressiven Eigenschaften der T_{reg} . Entfernt man $TGF\beta$ von den T_{reg} , führt dies jedoch zu einer verminderten suppressiven Funktion und schlechterem Überleben in vivo.[117] $TGF\beta$ wird in vivo außerdem von Makrophagen und glatten Muskelzellen sekretiert und hat eine antiinflammatorische Wirkung.[45]

Ein weiteres, essentielles Zytokin für das Überleben und die Funktionstüchtigkeit der T_{reg} ist IL-2. Im murinen und menschlichen Organismus wird IL-2 nicht von den T_{reg} selber gebildet, sondern von anderen aktivierten Zellen wie T_H1 -Zellen. Das Wachstum der T_{reg} ist dabei abhängig von IL-2.[118] T_{reg} besitzen einen hochaffinen IL-2-Rezeptor, bestehend aus α , β und γ Ketten (CD25, CD122, CD132). Über diesen Feedbackmechanismus organisiert sich möglicherweise das Immunsystem parakrin, da eine physiologische Antwort auf eine TCR-Stimulation ohne exogenes IL-2-Signal unter natürlichen Umständen nicht möglich ist.[119-121] Hünig et al. vermuten, dass im Rahmen der Terminierung einer Immunreaktion die beteiligten Zellen weniger IL-2 produzieren, was wiederum zum apoptotischen Zelltod der T_{reg} führt.[122]

Das von den T_{reg} und T_H2 -Zellen produzierte IL-10 wirkt atheroprotektiv.[109, 114, 116] Da die eher atherogenen T_H1 -Zellen die vorherrschende Gruppe unter den T-Zellen in der arteriosklerotischen Plaque stellen,[45, 123] wirken T_{reg} über ihre suppressorische Interaktionen am ehesten atheroprotektiv.

Suppressionsmechanismen der T_{reg}

Es existieren viele Vermutungen über die Suppressionsmechanismen der T_{reg} . In vitro kann über die Sekretion suppressorischer Zytokine wie IL-10, $TGF\beta$ und IL-35 die Funktion der FoxP3+ T-Responder-Zellen gehemmt werden.[29, 124] Das Protein CTLA-4 wird konstitutiv auf Treg exprimiert. Treg supprimieren über dieses die Funktion dendritischer Zellen mittels Blockade von CD80/86. Weiterhin können Treg durch Transendozytose von CD80 Antigen-

präsentierende Zellen „fressen“[125]. Pandiyan et al. stellen die Hypothese auf, dass T_{reg} kompetitiv IL-2 binden und zu einer Zytokin-vermittelten Deprivation mit folgender Apoptose der T-Effektor-Zellen führen.[126] Sie können andere Hypothesen widerlegen, laut derer T_{reg} die Induktion von IL-2-mRNA in FoxP3+ Responder-T-Zellen inhibieren sollen.[119] Grossman et al. vermuten eine Perforin-abhängige Zytolyse menschlicher CD4+ und CD8+ Zielzellen.[127, 128] Ob die Suppressionen antigenspezifisch oder unabhängig ablaufen wird kontrovers diskutiert. Auch sind die Ergebnisse von in vitro und in vivo Versuchen oft nicht übereinstimmend.[83] Ein deutlicher Hinweis darauf, dass T_{reg} intensiv mit Antigenen interagieren, zeigt aber zum Beispiel die wesentliche Erhöhung der T_{reg} Zahl im Mucosa-assoziierten Gewebe des Darmes, wo eine verstärkte Präsenz von Antigenen jedweder Art herrscht.[112]

Fasst man die aktuellen Hypothesen zusammen, hemmen T_{reg} nach vermutlich antigenspezifischer Aktivierung über Zell-Kontakte und/oder durch Zytokinsekretion die Bildung und Differenzierung von T-Effektorzellen wie T_H1 -, T_H2 - und CD8+ zytotoxischen T-Zellen (CTL) oder Dendritischen Zellen und steuern darüber die Immunantworten im Körper.

1.3 Aktuell etablierte Therapieformen gegen Arteriosklerose

Die aktuell klinisch relevanten Möglichkeiten der Prävention und Therapie der Arteriosklerose sind noch immer begrenzt. Konservativ versucht man v.a. die Risikofaktoren der Arteriosklerose durch Lebensstiländerung wie Nikotinabstinenz, ausgewogene Ernährung und Sport zu minimieren. Medikamentös kommen eine Reihe von Lipidsenkern wie HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine), Ezetimib, Fibrate, Anionenaustauschharze u.v.m. zum Einsatz, die insbesondere Spiegel des atherogenen LDL mindern, wodurch weniger Oxidationsprodukte desselben entstehen. Erforscht werden zudem antiinflammatorische Medikamente zur Blockade von $TNF\alpha$, IL-2-Rezeptor-alpha und Leukotrienen.[107] Im fortgeschrittenen Stadium sind endovaskuläre Therapien wie Atherektomien, Ballonangioplastien, Thrombektomien und interventionelle Stent-Einlagen beim Menschen etabliert. Im akuten Stadium der Thrombembolie werden je nach betroffenem Organ offen operative- oder

Einleitung

kathetergestützte Embolektomien oder lokale oder systemische Lysetherapien durchgeführt.

In Tiermodellen wurden bereits erste Erfolge im Sinne einer Immunisierung gegen Arteriosklerose erzielt. Hier haben bisher Immunisierungen mit oxidierten LDL-Partikeln, Streptococcus pneumoniae- und ApoB-100-Peptiden eine Reduktion der Plaquerfläche erreichen können.[129-131]

1.4 Verwendete Antikörper

Die Aktivität der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen kann über verschiedene Oberflächenmarker modifiziert werden. Für die Aktivierung der T_{reg} sind insbesondere folgende Rezeptoren von Bedeutung: Der T-Zell-Rezeptor, der mit MHC II Molekülen von Antigen-präsentierenden Zellen („APC“) interagiert, CD28, das als notwendiges costimulatorisches Molekül an die Liganden CD80 und CD86 (B7.1 und B7.2) bindet und CD25, das die α Kette des IL-2-Rezeptors darstellt. Diese Liganden werden von den APCs nur nach vorheriger Aktivierung exprimiert, wodurch die Initiation der T_{reg}-Aktivierung kontrolliert wird.[132]

In der vorliegenden Arbeit wurde ein anti-CD25 Antikörper (PC61) verwendet um T_{reg} zu supprimieren und ein CD28 superagonistischer Antikörper, um eine polyklonale Stimulation der T_{reg} zu induzieren.

Der von der Arbeitsgruppe Hünig entwickelte murine, CD28-spezifische superagonistische monoklonale Antikörper (im Folgenden kurz „D665“ (wenn mausspezifisch) oder „CD28 Superagonist“ (wenn speziesübergreifend) genannt), führt zu einer transienten, polyklonalen, antigenunabhängigen Aktivierung aller CD4-T-Zellen und in geringerem Grad auch zu einer B-Zell-Aktivierung.[85, 133] Unter den T-Zellen werden insbesondere regulatorische T-Zellen aktiviert und induziert und unterdrücken die weitere Aktivierung der anderen „konventionellen“ CD4-T-Zellen.[85] Bei niedriger Dosierung des CD28 Superagonisten werden nur T_{reg} expandiert.[84] Hünig erklärt diesen Effekt mit der Autoreaktivität der T_{reg}. T_{reg} werden kontinuierlich durch körpereigene Antigene stimuliert und haben dadurch kontinuierlich starke TCR-Signale. Schon

Einleitung

eine geringe Dosis des CD28 Superagonisten kann sie aktivieren. Konventionelle T-Zellen hingegen haben ausserhalb einer Immunantwort nur schwache „tonische“ Signale. Zum Erreichen einer Aktivierungsschwelle brauchen sie einen stärkeren Signalinput des costimulatorischen Rezeptors CD28.[134] D665 bindet an eine Membran-nahe laterale Domäne des B7-Moleküls und führt zu einer Expansion und starken Aktivierung der T_{reg}. [132] Die T_{reg} werden hierbei vorwiegend aus einem Pool bereits existierender CD4+CD25+ T-Zellen aktiviert.[85, 86]

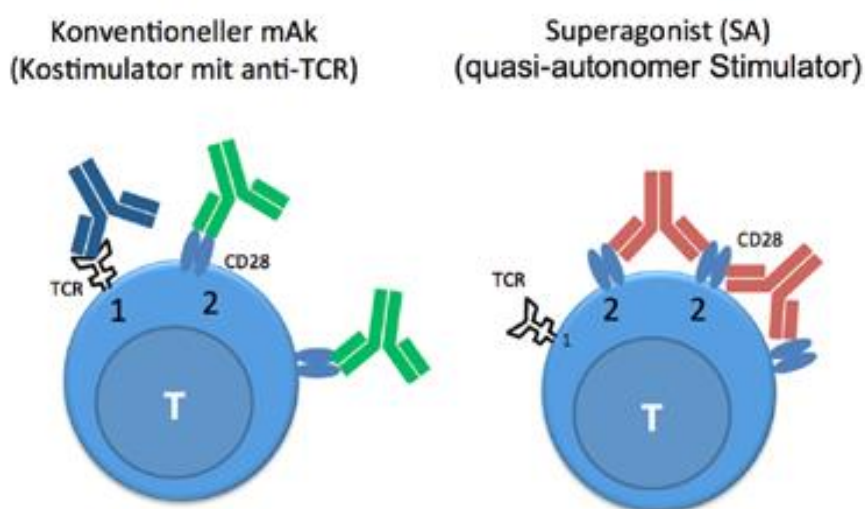


Abb. 3: Wirkprinzip des CD28 Superagonisten D665

Links: Konventionelle mAK binden nur monovalent (schwaches „Signal zwei“. Für die T-Zell-Aktivierung muss der TCR ebenfalls aktiviert werden. Rechts: Der laterale Bindungsmodus des CD28 Superagonisten erlaubt extensive Quervernetzung und damit ein ebenso starkes „Signal 2“, das schwache, „tonische“ TCR-Signale für die Aktivierung ausreichen. (übernommen mit freundlicher Genehmigung aus Huenig, 2015[134])

Erforscht wurde der CD28 Superagonist bisher vor allem im Hinblick seiner Wirkung auf Autoimmunerkrankungen. Durch eine solche T_{reg}-Stimulation und -Amplifikation konnten bereits verschiedene Autoimmunerkrankungen wie die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis[84] und Autoimmunneuritis[98] deutlich gebessert werden.

Mechanistisch kommt es durch die polyklonale Stimulation des CD28-Rezeptors zu einer Aktivierung von konventionellen CD4+ T-Zellen, diese produzieren

Einleitung

vermehrt IL-2. Gleichzeitig werden T_{reg} aktiviert, induziert und amplifiziert. Unterstützend wirkt dabei das IL-2 der CD4+ T-Zellen. Die T_{reg} schütten vermehrt das antiinflammatorische IL-10 aus[85] und exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3.[84] Schon geringe Dosen (0,5mg/kg KG) haben bei Beyersdorf et al. bei Versuchen in der Ratte eine T_{reg} -Aktivierung induziert, mit nur marginaler Expansion konventioneller T-Zellen. Auch 10-fach höhere Dosen haben keine Zeichen von Nebenwirkungen wie Autoimmunerkrankungen oder Entzündungsreaktionen bewirkt.[84]

Der andere in dieser Arbeit verwendete Antikörper, im weiteren PC61 genannt, depletiert spezifisch die den CD25+-Rezeptor tragenden Zellen. Zu diesen gehören aktivierte T-Zellen wie die T_{reg} , aber auch Anteile von CD4+-Effektor-T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen.[135] Durch Blockade des CD25+-Rezeptors können die Zellen keine Signale mehr aufnehmen, sie werden inaktiv und sterben schließlich. PC61 kann ausserdem in vitro die Antikörper-abhängige Phagozytose von CD25+ Zellen durch spezielle Makrophagen induzieren.[136]

Als Negativkontrollen der Versuche dienten ein IgG2a-kappa-Isotyp-Negativkontrollantikörper („MOPC“) sowie die Pufferlösung Phosphate Buffered Saline („PBS“), die beide zu keiner bekannten Reaktion im Organismus führen.

1.5 Ziel der Arbeit

Regulatorische T-Zellen bewirken nach derzeitigem Kenntnisstand über die Modulation von T-Helferzellreaktionen eine Reduktion der vaskulären Plaquerfläche. Demnach sollte es möglich sein mittels Amplifizierung oder Depletion dieser Zellen Veränderungen der Plaquerfläche zu induzieren.

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden,

- (1) ob eine Amplifikation der T_{reg} in unserem ApoEko Tiermodell möglich ist,
- (2) ob diese amplifizierten T_{reg} einen atheroprotektiven Effekt ausüben und
- (3) ob es einen Unterschied macht, ob der Antikörper in einem „immunologisch gesunden“ oder einem vorher mit dem CD25+ Antikörper PC61 T_{reg} depletierten, „ T_{reg} -geschwächten“ Tiermodell appliziert wird.

Eine solche „Immunisierung“ gegen Arteriosklerose würde der Medizin neue präventive und therapeutische Angriffspunkte gegen eine der führenden Todesursachen der westlichen Welt liefern.

In der ersten Versuchsreihe wird geprüft, ob eine Amplifizierung und Stimulation der T_{reg} durch den CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper (D665) auch in der ApoEko-Maus eine Plaquereduktion bewirkt.

Aus vielfältigen Studien weiß man heute, dass insbesondere Individuen mit Autoimmunerkrankungen (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Systemischer Lupus erythematodes, usw.) verstärkte Arteriosklerose aufweisen. Ein solches Krankheitsmodell soll im zweiten Teil dieser Arbeit mittels Depletion der T_{reg} durch den CD25+ Antikörper (PC61) simuliert werden. Die gleichen Tiere werden im Versuchsablauf durch Injektion mit dem CD28 Superagonisten (D665) „therapiert“, indem ihre endogenen T_{reg} stimuliert werden. Der Grad der Arteriosklerose wird mittels Planimetrie der Plaquerfläche der Aorta, die Wirksamkeit der Antikörper durch FACS-Analysen belegt.

Als Tiermodell dienen ApoEko-Mäuse. Aufgrund des fehlenden ApoE-Rezeptors kommt es zu erhöhten Cholesterinwerten im Blut mit spontaner, frühzeitigerer und im Verlauf ausgeprägter Arterioskleroseentwicklung.[137]

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer

Organentnahme

- Avertin (Narkoselösung) Fluka®, Hannover
- Heparin (1000 U/ml) Ratiopharm®, Ulm

Planimetrie und Imaging

- PBS (Phosphate Buffered Saline):
 - 9,55 g PBS Biochrom® AG, Berlin
 - gelöst in 1 l destilliertem Wasser, pH 7,4
- Sudan IV:
 - 0,5% Sudan IV Sigma®, Deutschland
 - 35% Ethanol J.T. Baker®, Niederlande
 - 50% Azeton J.T. Baker®, Niederlande
- Ethanol 70%ig J.T. Baker®, Niederlande

Elastica van Gieson

- Resorchinfuchsin Chroma-Gesellschaft®
- Ethanol J.T. Baker®, Niederlande
- Weigert's Hämalaun:
 - Hämatoxylin Merck®, Darmstadt
 - Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat Merck®, Darmstadt
 - Eisen(II)-Chlorid-Wasserfrei Merck®, Darmstadt
- 25%ige HCL-Säure Merck®, Darmstadt
- Xylol Fischer Chemicals®, Zürich, Schweiz
- Säurefuchsin:
 - 1% Säurefuchsin Chroma-Gesellschaft®
 - Pikrinsäure

Material und Methoden

Cholesterinmessung

- Cholesterolreagenz Infinity™
Termo®, Grenoble, Frankreich
- Standard 100, 200, 400
Sigma®, Deutschland
- HPLC-H2O
AppliChem®, Darmstadt

FACS-Analyse

Die FACS-Analysen dieser Arbeit wurden in freundlicher Unterstützung durchgeführt von Dr. Karin Elflein, Immunologie Universitätsklinik Würzburg, Team Professor Hünig. Zum von ihr verwendeten Material siehe bitte ihre Veröffentlichung „Verstärkung und Modulation der Immunantwort der Ratte mit Hilfe eines superagonistischen, CD28-spezifischen, monoklonalen Antikörpers“, [138], veröffentlicht durch die Universitätsbibliothek der Universität Würzburg.

- PBS:
 - 8 g NaCl
Ferak®, Berlin
 - 1,15 g Na₂HPO₄
Roth®, Karlsruhe
 - 0,2 g KCl
Roth®, Karlsruhe
 - 0,2 g KH₂PO₄
Roth®, Karlsruhe
 - 0,17 g CaCl₂
Roth®, Karlsruhe
 - 0,1 g MgCl₂
Roth®, Karlsruhe
 - Auf 1 l destilliertes Wasser, pH 7,4
- RPMI- 1640 Medium
Gibco / BRL, Eggenstein, Deutschland

2.1.2 Antikörper

- D665
TeGenero®
ImmunoTherapeutics AG,
Würzburg / Exbio®, Prag,
Czechische Republik /
Invivo®, Hennigsdorf bei
Berlin
- PC61
Exbio®, Prag
- MOPC, alternativ PPV6
Exbio®, Prag / BD
Pharmingen®, Heidelberg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Flüssigstickstoff Linde®, Pfungen, Schweiz
- Pinzetten + Mikronadeln Fine Science Tools®, Heidelberg
- Scheren Akula®, Lauf an der Pegnitz
- „Omnifix-F 1“ ml Spritze Braun®, Melsungen
- Objektträger Menzel® GmbH, Braunschweig
- Deckgläser Marienfeld®, Lauda-Königshofen
- TissueTek® Sakura Finetec®, Heppenheim
- Pipetten „pipetman“ Gilson International®, Limburg-Offheim
- Pipettenspitzen „ultratip“ Greiner bio-one®, Solingen
- PP-Test Gefäße „cellstar“ (15 ml) Greiner bio-one®, Solingen
- Eppendorf Gefäße Greiner bio-one®, Solingen
- Faltenfilter (240 mm) Hartenstein®, Würzburg
- Petrischalen 55 x 15 mm Hartenstein®, Würzburg
- Farb-Umkehrfilm „T64 professional Tungsten“ Fujichrome®
- Mikrotiterplatte Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- 12x75 mm “round-bottom test tubes” Falcon® Cat. No. 2008

2.1.4 Technische Geräte

- Stereomikroskop „MZ 6“ Leica®, Deutschland
- Leitz®-Kamera 35 mm Leica®, Deutschland
- Kaltlichtquelle KL 1500 LCD 230V Schott®
- Videokamera COHU®
- Mikroskop „Axioskop 2 Plus“ Zeiss®, Deutschland
- Kamera „Insight 4Mpixel“ Visitron Systems GmbH, Deutschland
- Zentrifuge „5417 R“ Eppendorf®, Deutschland
- Kryostat „CM 1850“ Leica®, Deutschland

Material und Methoden

- Cold plate „NOX-E.2-CP“ Noxygen®, Deutschland
- Vortexer „REAX 2000“ Heidolph®, Deutschland.
- Magnetrührer „IKAMAG“ IKA® Werke GmbH
- Flowzytometer „FACScalibur“ Becton Dickinson®, Heidelberg
- Spektrophotometer Molecular Devices®, München
- Neubauer-Zählkammer Hartenstein®, Würzburg

2.1.5 Software

- Image-Pro-Plus®, Version 4.1 Media Cybernetics®, USA
- SigmaPlot® Version 8.0 SPSS.Inc®, USA
- SPOT Basic® 4.0.9 Diagnostic Instruments, Inc.®
- LYSIS II® Becton Dickinson®
- CellQuest® (Apple-Macintosh) BD Bioscience®
- Softmax® (Spektrophotometer) Molecular Devices®, München
- Microsoft Office® Microsoft®

2.2 Methoden

2.2.1 Mäuse / Genotypen / Diät

Alle Tierexperimente wurden durch die Ethikkommission der Universität Würzburg bewilligt und konform mit den Regeln der Universität Würzburg und den Gesetzen des Tierschutzes durchgeführt.

Für die Versuche wurden Apolipoprotein-Knockout Mäuse („ApoEko“) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) verwendet.[137] Sie wurden zunächst über 10 Generationen zu ihrem genetischen C57 / B16-Hintergrund zurückgekreuzt. Mittels Polymerasekettenreaktion aus der Schwanzspitze wurden die ApoEko-Mäuse genotypisiert. Die Tiere wurden in einem Tierstall mit Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten und im Alter von 3 Wochen vom Muttertier entwöhnt. Während der Versuche wurden die ApoEko-Mäuse auf eine „western-type“ Diät (Harlan Teklad, USA) gesetzt, eine im Fettgehalt deutlich erhöhte Diät

(42% der Gesamtkalorien entstammen aus Fett, 0,15% Cholesterin) mit dadurch stark atherogener Wirkung.

2.2.2 Injektionsschemata der Antikörper

Die Aktivität der CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen kann über verschiedene Oberflächenmarker als Angriffspunkte modifiziert werden. Der CD28-spezifische superagonistische monoklonale Antikörper D665 kann ohne zusätzliche T-Zell-Rezeptor Interaktion regulatorische T-Zellen aktivieren. Ein anderer Antikörper, PC61, depletiert spezifisch CD25+-T-Zellen. Die Injektionen erfolgten intraperitoneal. Grundlage dieser Arbeit sind zwei Hauptversuchsreihen:

Versuch A: Alleinige Stimulation der T_{reg} durch zweimalige Injektion mit dem CD28 Superagonisten D665.

Versuch B: Zunächst Depletion der T_{reg} durch zweimalige Injektion des CD25+ Antikörpers PC61. Jeweils eine Woche später folgt eine Stimulation der T_{reg} durch den CD28 Superagonisten D665.

Versuch zur Auswirkung der Amplifikation regulatorischer T-Zellen durch den CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper D665 (Versuch A)

Mit Versuchsbeginn wurden weibliche ApoEko-Mäuse (Woche 0, im Alter von 13 Wochen) auf „western-type“ Diät gesetzt und 100 µg des Antikörpers D665 bzw. als Kontrolle MOPC intraperitoneal injiziert. In Versuchswoche 4 erfolgte eine erneute Injektion mit 100 µg D665 bzw. MOPC. Die Organentnahme erfolgte in Versuchswoche 8, vier Wochen nach der zweiten Injektion im Alter von 21 Wochen. Die Aorta wurde im Ganzen für Imaging und Planimetrie entnommen und die Zellen der Milz und des Blutes in FACS-Analysen untersucht. Physiologische Parameter wie Gewicht und Gesamtcholesterin wurden verglichen.

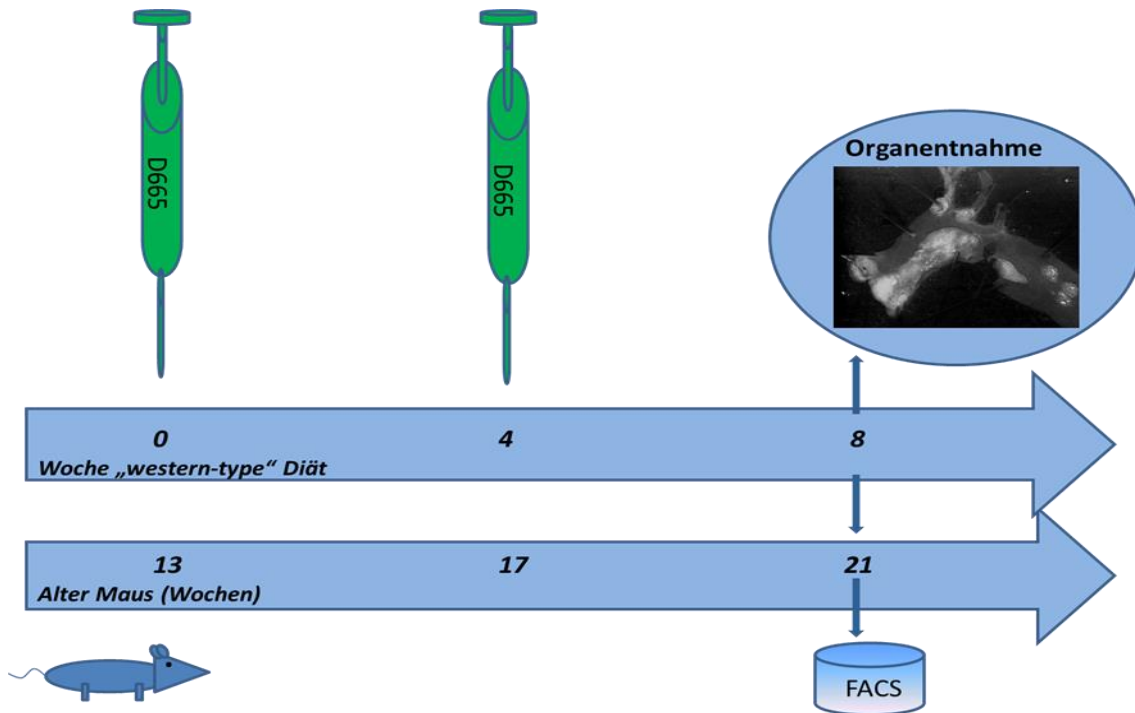


Abb. 4: Versuchsaufbau (Versuch A) - zweimalige D665-Injektion

Versuch zur Auswirkung der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die Plaqueeentwicklung in ApoEko-Mäusen und therapeutische Wirkung der T_{reg} nach folgender Amplifikation (Versuch B)

In der zweiten Versuchsreihe wurden weibliche ApoEko-Mäuse (Versuchswoche null, im Alter von sechs Wochen) auf „western-type“ Diät gesetzt. In Woche null und vier erfolgte die Impfung mit dem T_{reg} -depletierenden Antikörper PC61 bzw. mit dem Kontroll-Antikörper MOPC (Kontrollgruppe). In Versuchswoche eins und fünf wurde der T_{reg} -stimulierenden Antikörper D665 injiziert. Als Kontrolle diente erneut MOPC. Eine „fluorescence-activated cell sorter“-Analyse („FACS-Analyse“) aus retroorbital in Kurznarkose gewonnenem Blut folgte jeweils eine Woche später (Woche zwei und sechs). In der achten Versuchswoche folgte die Organ- und Blutentnahme. Das Alter der Mäuse betrug zu diesem Zeitpunkt 14 Wochen. Die Aorta wurde für Planimetrie und Imaging präpariert und Blut und Milz in FACS-Analysen untersucht. Die Karotiden wurden für histologische Untersuchungen in TissueTek® konserviert. Zusammenfassend bestand die erste Versuchsreihe aus drei Gruppen. Gruppe 1 erhielt zwei Injektionen mit

PC61, jeweils gefolgt von einer D665 Injektion. Der Gruppe 2 wurde zwei Mal PC61 injiziert, jeweils gefolgt von einer Injektion des Kontrollantikörpers MOPC. Die 3. Gruppe erhielt nur Kontrollantikörper. In den Versuchswochen zwei, sechs und acht erfolgten FACS-Analysen.

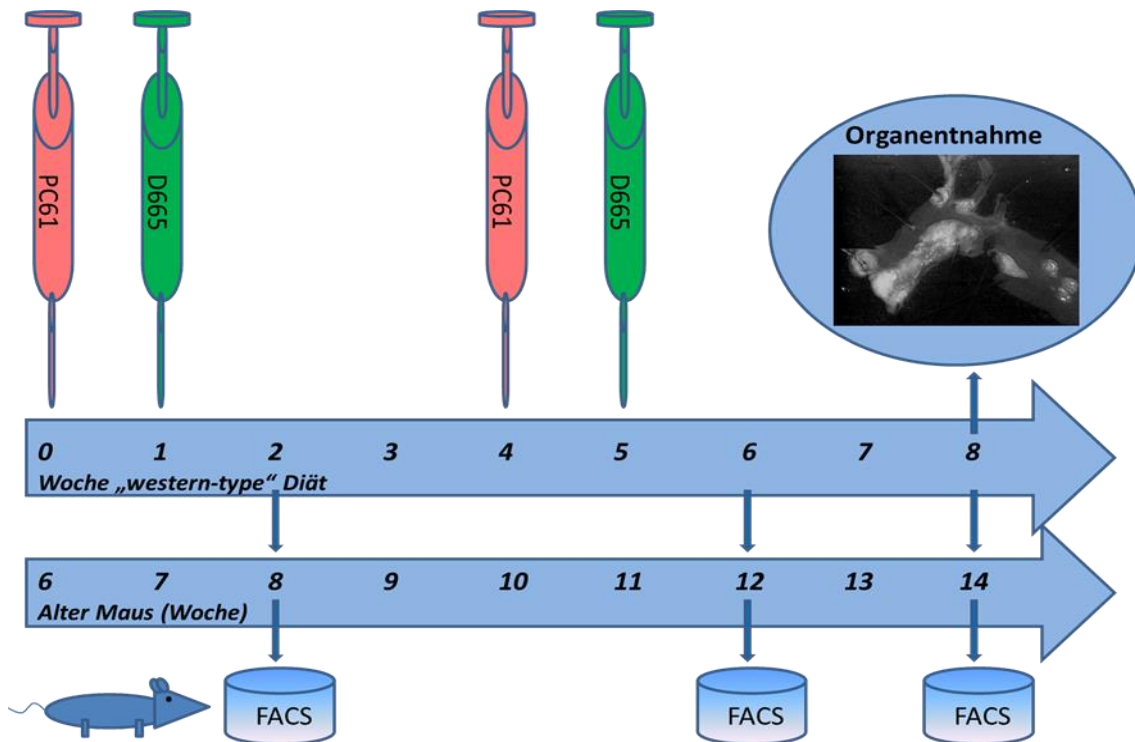


Abb. 5: Versuchsaufbau (Versuch B) - zweimalige PC61-Injektion gefolgt von D665-Injektion

Versuche zum Wirksamkeitsnachweis von D665 (Versuch C)

Um die Wirksamkeit des CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpers D665 auf die T_{reg} zu belegen, wurden männliche ApoEko-Mäuse einmalig mit 100 μ g D665 geimpft. An Tag drei post injectionem wurde in Narkose Retroorbitalblut entnommen. Eine weitere Blut- und Organentnahme fand an Tag acht statt.

Eine andere Gruppe weiblicher ApoEko-Mäuse wurde nach zweimaliger Injektion mit 100 μ g Antikörper D665 im Abstand von vier Wochen 14 Tage nach zweiter

Injektion untersucht. Blutproben und Milzen wurden mittels FACS-Analysen auf ihre Zellbestandteile untersucht. Färbungen für CD4+, CD25+ und FoxP3+ Zellen wurden durchgeführt.

Versuch zur Dosisfindung von PC61 (Versuch D)

Zur Bestimmung der wirksamsten T_{reg}-depletierenden Dosis des Antikörpers PC61 wurden gemischtgeschlechtliche ApoEko-Mäuse einmalig mit 100 µg bzw. 300 µg PC61 intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle diente PBS. Am fünften Tag nach Injektion wurden aus Blut und Milz FACS-Analysen mit den Färbungen CD4, CD25 und FoxP3 durchgeführt.

2.2.3 Organentnahme

Fünf Minuten nach intraperitonealer Injektion von 100 U Heparin wurde das Tier mit 0,8 ml Avertin intraperitoneal anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde überprüft, der Situs eröffnet und mittels einer heparinisierten Omnifix®-Spritze mit 25G-Kanüle ca. 1 ml Vollblut entnommen. Das Vollblut wurde zur raschen Weiterverarbeitung auf Eis gelegt oder bei 10000 U/min für 5 min abzentrifugiert, das Serum abpipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Milz wurde entnommen und in „RPMI 1640“ Medium für FACS-Analysen konserviert. Die Aorta wurde mit 3 ml eiskaltem PBS (pH 7,4) gespült und anschließend unter mikroskopischer Sicht vom Aortenbogen bis zur iliakalen Bifurkation freipräpariert und in 4% Paraformaldehyd eingelegt.

2.2.4 Planimetrie und Imaging: Plaquefläche

Die Aorta wurde unter mikroskopischer Sicht mit Feinbesteck von adventitiellem Fett- und Bindegewebe freipräpariert und von der iliakalen Bifurkation bis zur Aortenwurzel longitudinal aufgeschnitten. Sie wurde dann gestreckt und plan mit der Innenseite nach oben auf ein schwarzes Wachs Brett gepinnt. Über eine auf ein Stereomikroskop (Leica® MZ 6) montierte Schwarz-Weiß Videokamera (COHU®) wurden Fotos von der eröffneten Aorta aufgenommen und mit dem Programm Image-Pro-Plus® digitalisiert. Die arteriosklerotischen Läsionen wurden danach mit Sudan IV Lösung zur besseren Identifizierung rot gefärbt und Farbfotos mit einer Leica® 35 mm Kamera aufgenommen. Der prozentuale Anteil

der Plauefläche an der Gesamtfläche der Aorta wurde im Programm Image-Pro Plus® (Version 4.1; Media Cybernetics®) mittels Oberflächenplanimetrie berechnet. Statistisch analysiert wurden die Daten mit dem Programm SigmaPlot® (Version 8.0) und dem Student's T-Test.

2.2.5 FACS-Analyse von Blut und Milz

Die FACS-Analysen dieser Arbeit wurden in freundlicher Unterstützung durchgeführt von Dr. Karin Elflein, Immunologie Universitätsklinik Würzburg, Team Professor Hünig. Zur Methodik siehe bitte ihre Veröffentlichung „Verstärkung und Modulation der Immunantwort der Ratte mit Hilfe eines superagonistischen, CD28-spezifischen, monoklonalen Antikörpers“, [138], veröffentlicht durch die Universitätsbibliothek der Universität Würzburg. Die Zellsuspensionen wurden mit der FACS-Maschine FACScalibur® und der Software LYSIS II® analysiert. Die Rohdaten wurden mit der Cell-Quest®-Software durch Dr. Karin Elflein erhoben. Die statistische Auswertung, Interpretation und graphische Darstellung mit Microsoft Office® und Sigma-Plot® erfolgte durch die Autorin dieser Arbeit.

Generierung des Vollblutes

Auf zwei Arten wurde Vollblut zur weiteren Untersuchung entnommen. Bei der retrobulbären Blutentnahme wurde dem narkotisierten Tier mittels heparinierter Glaskapillare Blut aus dem retrobulbären Venengeflecht abgenommen. Es wurden jeweils 50-100 µl Blut entnommen. Mit der oben beschriebenen direkten Punktion des rechten Ventrikels im Rahmen des Finalversuches wurde ca. 1 ml Blut entnommen.

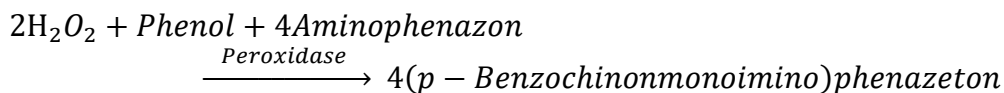
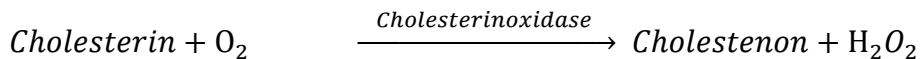
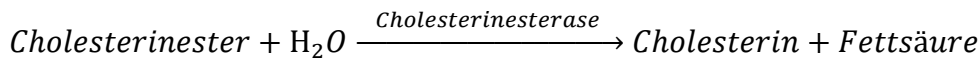
2.2.6 Cholesterinanalyse

Der Gesamtcholesterinspiegel im Plasma wurde spektrophotometrisch mit Hilfe enzymatischer Tests bestimmt. 10 µl Plasma wurden mit 10 µl HPLC-Wasser verdünnt, davon 2 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 200 µl Infinity™ Cholesterolreagenz hinzugegeben. Als Kontrollen wurden 20 µl HPLC-Wasser und Standardproben mit bekannter Cholesterinkonzentration mit 100, 200 und 400 mg/dl verwendet. Nach 10 Minuten Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C

Material und Methoden

wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm im Spektrophotometer gemessen und mit dem Programm Softmax® ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Plot® und dem Student's T-Test.

Im Cholesterolreagenz enthalten sind die Enzyme Cholesterinesterase, Cholesterinoxidase und eine Peroxidase. Am Ende mehrerer Reaktionsschritte entsteht 4 Aminophenazon, das zu rotem 4-P-Benzochinon-monoimino-phenazeton oxidiert wird. Die Farbintensität dieses Stoffes ist direkt proportional zur Cholesterinkonzentration und kann im Spektrophotometer gemessen werden.



2.3 Statistik

Die Angabe der Zellzahlen im Text erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Tieranzahl wird im Folgenden mit „N“, die statistische Berechnung mit dem Student's T-Test mit „P“ abgekürzt. $P < 0,05$ (markiert mit einem Stern „*“) und $P < 0,01$ (markiert mit 2 Sternen „**“) wurden als statistisch signifikant bewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Der CD28 Superagonist D665 amplifiziert signifikant regulatorische T-Zellen (Versuch C)

Um die Wirksamkeit des Antikörpers D665 auf regulatorische T-Zellen zu testen, wurden ApoEko-Mäuse mit 100 µg D665 injiziert und FACS-Analysen des Blutes (Tag drei, acht und vierzehn nach Injektion) sowie der Milz (Tag acht und vierzehn nach Injektion) durchgeführt.

An Tag 3 und 8 zeigte sich im Blut ein Trend zur Zunahme der T_{reg} nach D665 Injektion, ein Signifikanzniveau wurde bei geringer Tieranzahl jedoch nicht erreicht. (Werte siehe Tabelle 3)

Im Gegensatz hierzu konnte in Milzzellen am Tag 8 nach einmaliger Injektion mit D665 eine signifikante Amplifikation der CD4+FoxP3+ T-Zellen nachgewiesen werden. Die CD25+FoxP3+, CD4+CD25+ und die FoxP3+ an CD4+-Zellen zeigten bei nur sehr kleinen Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Ergebnisse

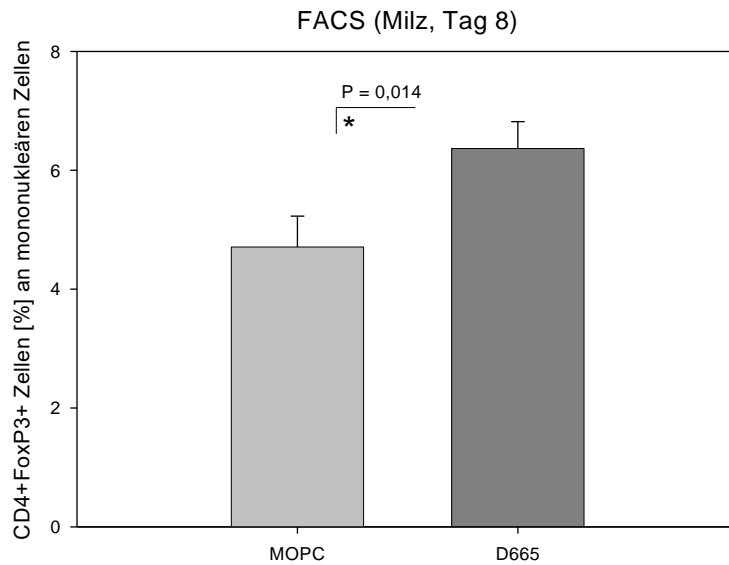


Abb. 6: FACS-Analyse (Milz) an Tag 8 nach einmaliger D665-Injektion

FACS-Analyse der Milz von männlichen ApoEko-Mäusen, 8 Tage nach einmaliger Injektion des CD28 Superagonisten D665. Dargestellt sind die jeweiligen Zelltypen in % an den mononukleären Zellen der Milz mit Standardabweichung. Tieranzahl pro Gruppe „N“=3.

* Signifikanter Unterschied ($P < 0,05$)

An Tag 14 nach zweimaliger D665-Injektion konnte im Blut eine signifikante Zunahme der CD4+CD25+ Zellen festgestellt werden. In der Milz zeigte sich zum gleichen Zeitpunkt kein Unterschied.

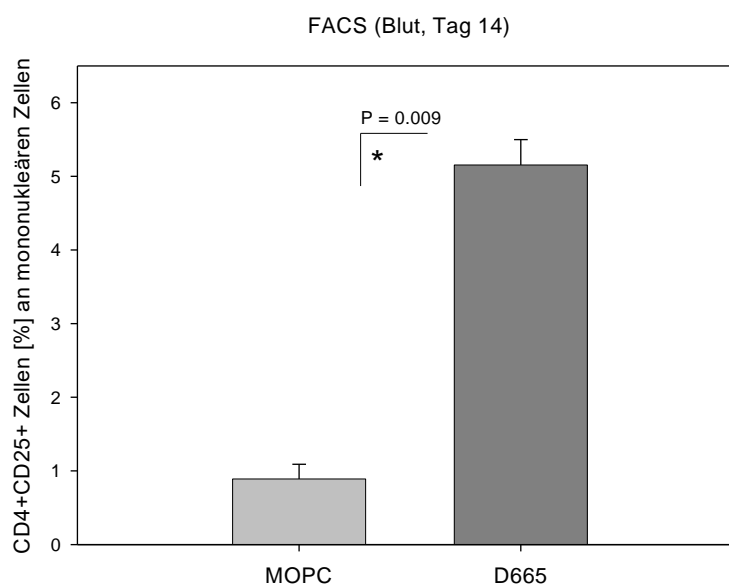


Abb. 7: FACS-Analyse (Blut), an Tag 14 nach zweimaliger D665-Injektion

FACS-Analyse des Blutes von weiblichen ApoEko-Mäusen, 14 Tage nach zweimaliger Injektion des CD28 Superagonisten D665. Dargestellt sind die jeweiligen Zelltypen in % an den mononukleären Zellen des Blutes mit Standardabweichung. Tierzahl pro Gruppe N = 2.

* Signifikanter Unterschied ($*P < 0,05$)

Ergebnisse

Anteil der jeweiligen Zellen an den mononukleären Zellen in Blut / Milz

CD4+FoxP3+	MOPC	D665	P-Wert	Anzahl
Tag 3 Blut	1,62% ± 0,86	2,54% ± 0,81	0,245	3
Tag 8 Blut	1,31% ± 0,54	2,12% ± 0,60	0,156	3
Tag 8 Milz	4,71% ± 0,52	6,37% ± 0,45	*0,014	3

CD4+CD25+	MOPC	D665	P-Wert	Anzahl
Tag 3 Blut	1,66% ± 0,88	2,28% ± 0,53	0,356	3
Tag 8 Blut	1,74% ± 0,56	2,55% ± 0,67	0,184	3
Tag 14 Blut	0,89% ± 0,28	5,16% ± 0,49	**0,009	2
Tag 8 Milz	5,37% ± 0,38	5,64% ± 0,90	0,656	3
Tag 14 Milz	3,23% ± 0,32	3,91% ± 0,68	0,325	2

CD25+FoxP3+	MOPC	D665	P-Wert	Anzahl
Tag 3 Blut	1,48% ± 0,69	2,30% ± 0,68	0,219	3
Tag 8 Blut	1,54% ± 0,67	2,10% ± 0,49	0,304	3
Tag 8 Milz	4,16% ± 0,39	4,58% ± 0,39	0,260	3

FoxP3+ an CD4+	MOPC	D665	P-Wert	Anzahl
Tag 3 Blut	16,9% ± 6,27	22,97% ± 9,60	0,411	3
Tag 8 Blut	12,80% ± 5,59	22,23% ± 6,34	0,125	3
Tag 8 Milz	23,73% ± 1,66	30,30% ± 7,00	0,189	3

Tab. 1: FACS-Analyse (Blut und Milz) an Tag 3, 8 und 14 nach einmaliger D665-Injektion

FACS-Analyse aus Blut und Milz von ApoEko-Mäusen nach einmaliger Injektion mit dem CD28 Superagonisten D665. FACS-Analyse an Tag 3 und 8 nach D665-Injektion, sowie an Tag 14 nach zweimaliger Injektion mit D665. Geschlechter: Tiere von Tag 3 und 8 männlich, Tag 14 weiblich. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung des Anteils der jeweiligen Zellreihe an den mononukleären Zellen des Blutes und der Milz bzw. an den CD4+ Zellen des Blutes, die Anzahl der Tiere pro Gruppe „N“ sowie die statistische Wahrscheinlichkeit mittels Student's T-Test „P“. * Signifikanter Unterschied (*P < 0,05; **P < 0,01)

3.2 Der CD25-spezifische monoklonale Antikörper PC61 reduziert signifikant die T_{reg}-Zahl in ApoEko-Mäusen (Versuch D)

Um eine angemessene T_{reg}-depletierende Dosis zu finden, wurden ApoEko-Mäuse mit 100 µg bzw. 300 µg PC61 injiziert und Blut und Milz an Tag fünf mittels FACS-Analyse untersucht.

Die CD4⁺FoxP3⁺ Zellen der Milz wurden sowohl mit 100 µg PC61 (1,46% ± 0,26; N = 3; P = 0,048) als auch mit 300 µg PC61 (1,52% ± 0,07; N = 3; P = 0,042) gleichwertig signifikant gegenüber der Kontrollgruppe depletiert. Ebenso wurde die Zahl der FoxP3⁺CD25⁺-Zellen signifikant vermindert (100 µg PC61: 0,79% ± 0,16, N = 3, P = 0,002; 300 µg PC61: 0,89% ± 0,09, N = 3, P = 0,002).

Im Blut zeigte sich eine signifikante Depletion der FoxP3⁺CD25⁺-Zellen mit 300 µg PC61 (0,49% ± 0,21, N = 3, P = 0,048). Mit 100 µg PC61 (0,58% ± 0,32, N = 3, P = 0,066) fiel eine deutliche Tendenz zur Depletion dieser Zellen auf. Bei den CD4⁺FoxP3⁺ Zellen war ein Trend zur Depletion der Zellreihe mit 100 µg PC61 (0,94% ± 0,27, N = 3, P = 0,148) und 300 µg (0,77% ± 0,27, N = 3, P = 0,108) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen.

Männliche und weibliche Tiere wurden gepoolt. Es zeigten sich in Milz und Blut keine signifikanten Unterschiede zwischen der Injektion von 100 µg oder 300 µg PC61. Die Versuche wurden daher mit der für den gewünschten Effekt gleichermaßen wirksamen Menge von 100 µg PC61 durchgeführt, da hiermit weniger potentielle Nebenwirkungen zu erwarten waren.

Ergebnisse

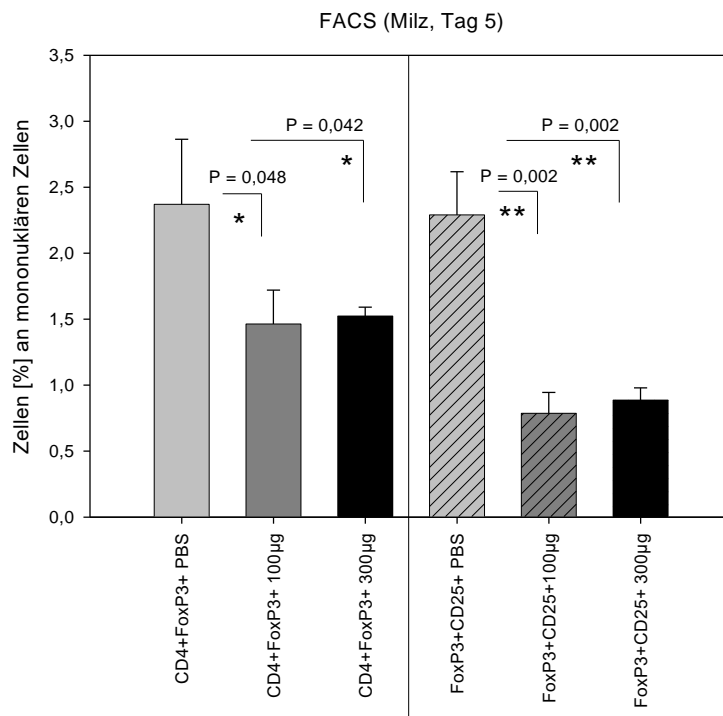


Abb. 8: FACS-Analyse Milz (Dosisfindung PC61)

FACS-Analyse der Milz von ApoEko-Mäusen 5 Tage nach einmaliger Injektion mit 100 µg bzw. 300 µg des T_{reg}-depletierenden CD25+-Antikörpers PC61. Dargestellt sind die jeweiligen Zelltypen in % an den mononukleären Zellen der Milz. Tierzahl pro Gruppe N = 3, Männchen und Weibchen gepoolt.

Signifikanter Unterschied (*P < 0,05, **P > 0,01)

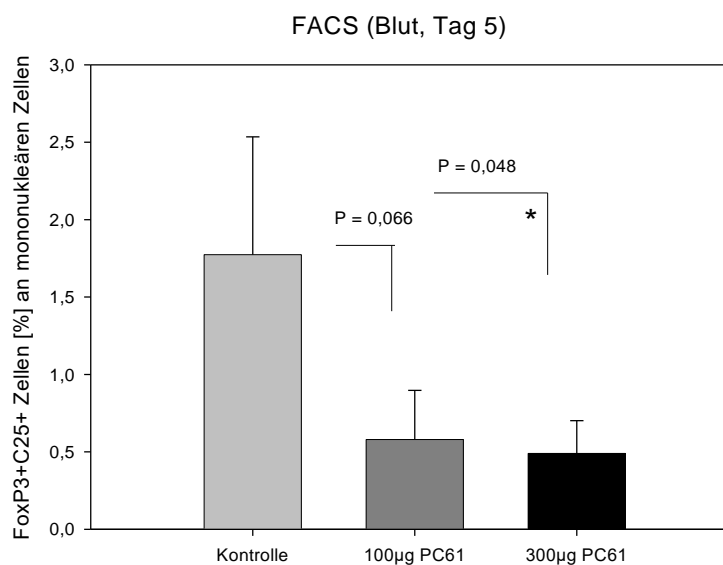


Abb. 9: FACS-Analyse Blut (Dosisfindung PC61)

FACS-Analyse des Blutes von ApoEko-Mäusen, 5 Tage nach einmaliger Injektion mit 100 µg bzw. 300 µg des T_{reg}-depletierenden CD25+-Antikörpers PC61. Dargestellt sind die jeweiligen Zelltypen in % an den mononukleären Zellen des Blutes. Tierzahl pro Gruppe N = 3, Männchen und Weibchen gepoolt.

Signifikanter Unterschied (*P < 0,05)

3.3 Die Amplifikation regulatorischer T-Zellen durch den Antikörper D665 hat keinen Einfluss auf die Arterioskleroseentwicklung in „gesunden“ ApoEko-Mäusen (Versuch A)

3.3.1 Plaquefläche

In diesem Versuch wurde ein hypercholesterinämes, aber sonst immunologisch „gesundes“ Tiermodell simuliert. Durch Amplifikation der T_{reg} nach Injektion mit 100 µg D665 ($20,38\% \pm 3,54$, N = 7, P = 0,581) konnte keine Reduktion der Plaquefläche gegenüber der Kontrollgruppe (IgG2ακ-AK = MOPC, $19,43\% \pm 2,18$, N = 6) in den weiblichen ApoEko-Mäusen nachgewiesen werden.

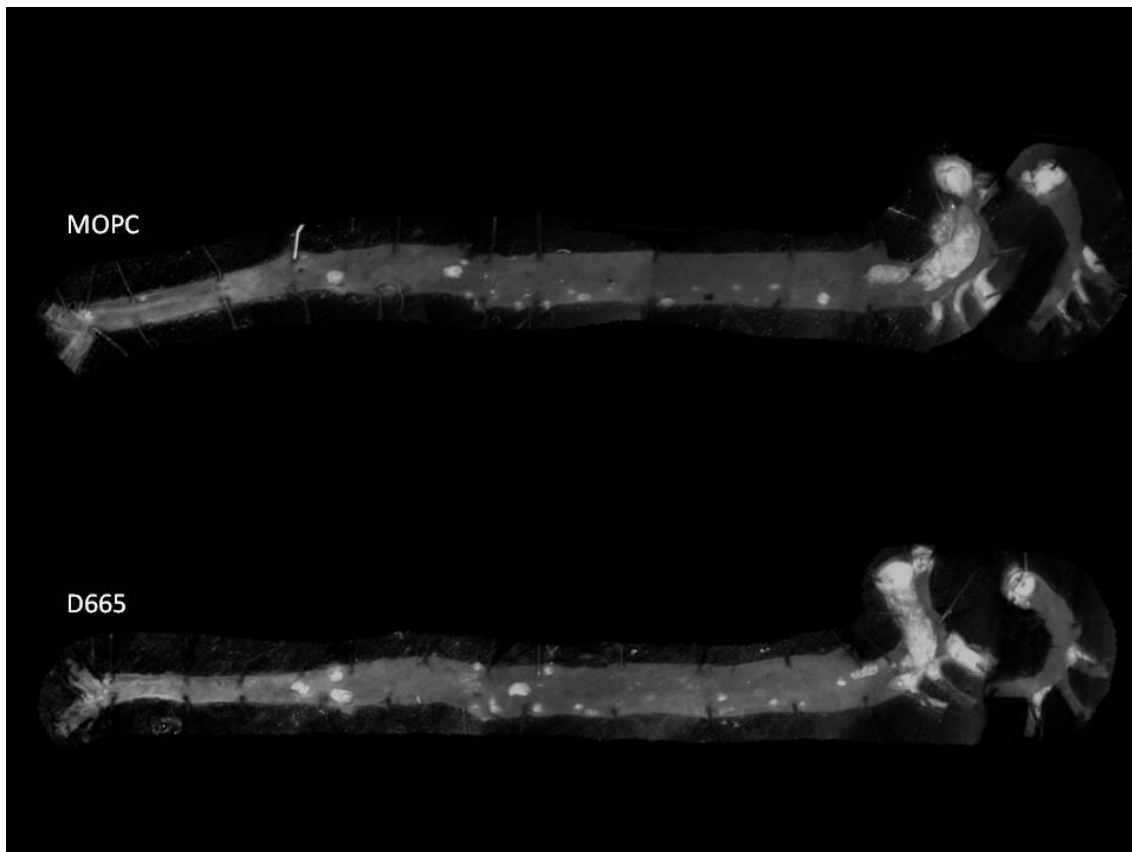


Abb. 10: Arteriosklerotische Plaques in der längs eröffneten Aorta nach D665-Injektion

Luminale Seite der längs eröffneten Aorten von 21 Wochen alten ApoEko-Mäusen nach 8 Wochen „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion mit dem CD28 Superagonisten D665. Die lipidreichen, angefärbten, im schwarz-weiß-Bild weiß erscheinenden arteriosklerotischen Plaques sind deutlich sichtbar.

Ergebnisse

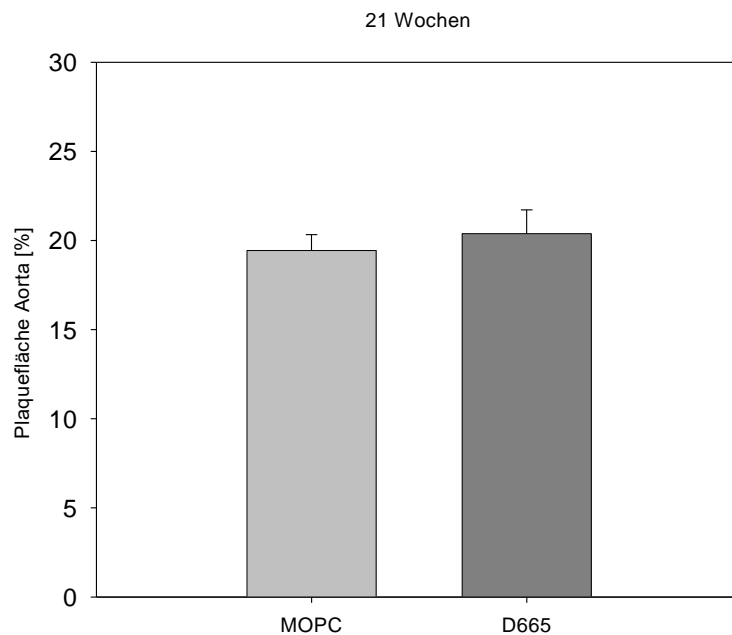


Abb. 11: Plaquefläche Aorta nach D665-Injektion

Prozentuale Plaquefläche der Aorta im Verhältnis zur Aortengesamtfläche von weiblichen ApoEko-Mäusen im Alter von 21 Wochen nach 8 Wochen „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion mit dem CD28 Superagonisten D665. Tierzahl pro Gruppe N = 6 / 7.

3.3.2 Gewicht, Cholesterin und Zellzahlen

Gewicht / Gesamtcholesterin:

In den vergleichenden Messungen des Gewichts und der Gesamtcholesterinwerte von weiblichen ApoEko-Mäusen nach 8 Wochen „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion des CD28 Superagonisten D665 zeigten sich an Tag 28 nach letzter Injektion keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchstier- und Kontrollgruppe.

Antikörper	Körpergewicht [g]	Gesamtcholesterin [mg/dl]	N
Kontrolle (MOPC)	26,65 ± 2,38	487,03 ± 109,79	6
D665	26,68 ± 1,67	502,74 ± 76,02	7
P-Wert	0,978	0,774	

Tab. 2: Körpergewicht und Gesamtcholesterin nach D665-Injektion

Messwerte von Körpergewicht [g] und Gesamtcholesterin [mg/dl] von weiblichen ApoEko-Mäusen im Alter von 21 Wochen nach 8 Wochen „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion mit dem CD28 Superagonisten D665. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung, Anzahl „N“ der Tiere sowie der P-Wert des Student's T-Tests.

T-Zell-Veränderungen

In den FACS-Analysen der Milz konnte an Tag 28 nach zweimaliger D665-Injektion kein signifikanter Unterschied der T-Zell-Subpopulationen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. (CD4+FoxP3+ Zellen (D665 3,56%±0,58, MOPC 4,12%±1,27; P=0,317), CD4+CD25+ Zellen (D665 4,30%±0,60, MOPC 4,11%±0,62; P=0,591), CD25+FoxP3+ Zellen (D665 2,57%±0,28, MOPC 2,72%±0,46; P=0,569) und der Anteil der FoxP3+ Zellen an den CD4+ Zellen (D665 20,74%±3,20, MOPC 25,64%±5,24; P=0,063)).

3.4 Die Amplifikation regulatorischer T-Zellen mit dem CD28 Superagonisten D665 nach initialer T_{reg}-Depletion mit dem Antikörper PC61 führt zu einer signifikanten Reduktion der Plaqueentwicklung (Versuch B)

3.4.1 Plaquefläche

Um den Effekt von D665 auf die Plaqueentwicklung in T_{reg}-depletierten Mäusen zu testen, wurden weibliche ApoEko-Mäuse unter „western-type“-Diät in Versuchswoche null und vier mit dem T_{reg}-depletierenden Antikörper PC61 behandelt und jeweils eine Woche später in Woche eins und fünf durch Injektion mit dem CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper D665 stimuliert. In Woche acht (im Alter von 14 Wochen) erfolgte die Organentnahme und morphometrische Bestimmung der arteriosklerotischen Plaquefläche der Aorta.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Plaquefläche um 28,73% bei den zunächst mit PC61 T_{reg}-depletierten und dann mit D665 stimulierten Tieren (3,82% ± 0,55; N = 10; P = 0,011) gegenüber der mit PC61+MOPC (5,36% ± 1,65; N = 11) allein injizierten Gruppe und um 32,02% gegenüber der Kontrollgruppe (MOPC+MOPC, 5,62% ± 1,95; N = 10; P = 0,012). Zwischen der alleinig T_{reg}-depletierten Gruppe (PC61+MOPC) und der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

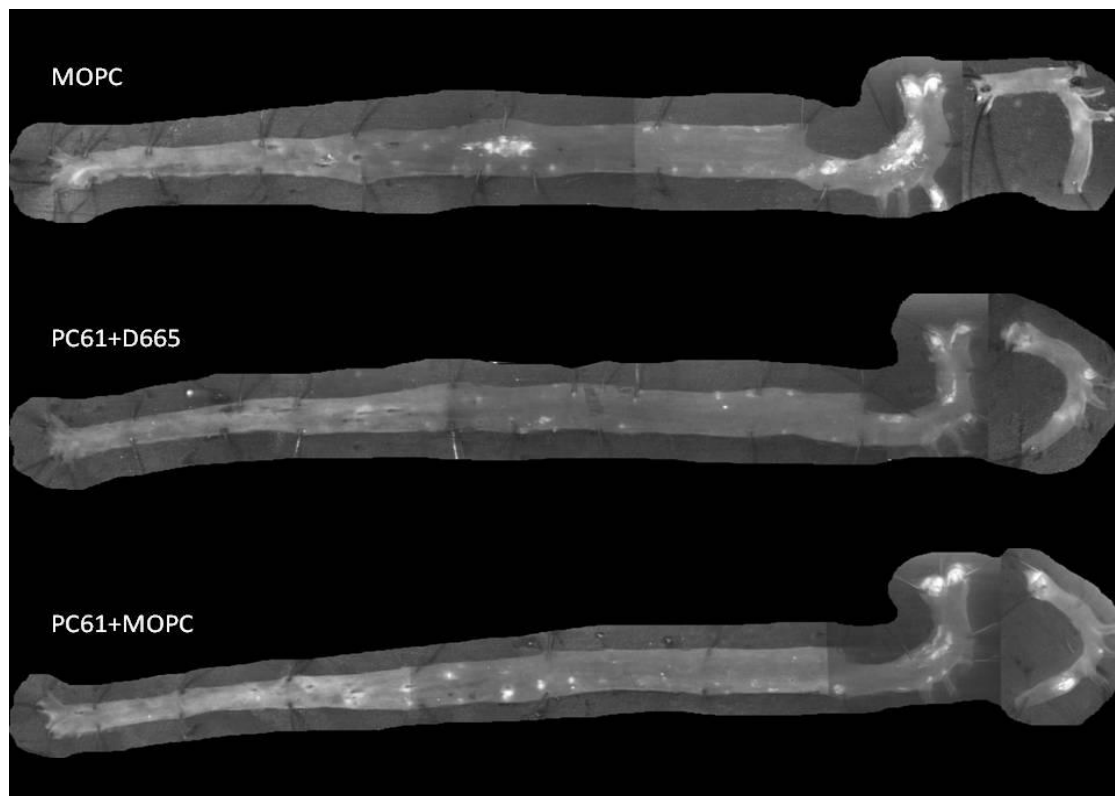


Abb. 12: Arteriosklerotische Plaques in der längs eröffneten Aorta nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC- Injektion

Luminale Seite der längs eröffneten Aorten von 14 Wochen alten weiblichen ApoEko-Mäusen nach 8 Wochen „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion mit dem CD28 Superagonisten D665 und/oder PC61. Die lipidreichen, angefärbten, im schwarz-weiß-Bild weiß erscheinenden arteriosklerotischen Plaques sind deutlich sichtbar.

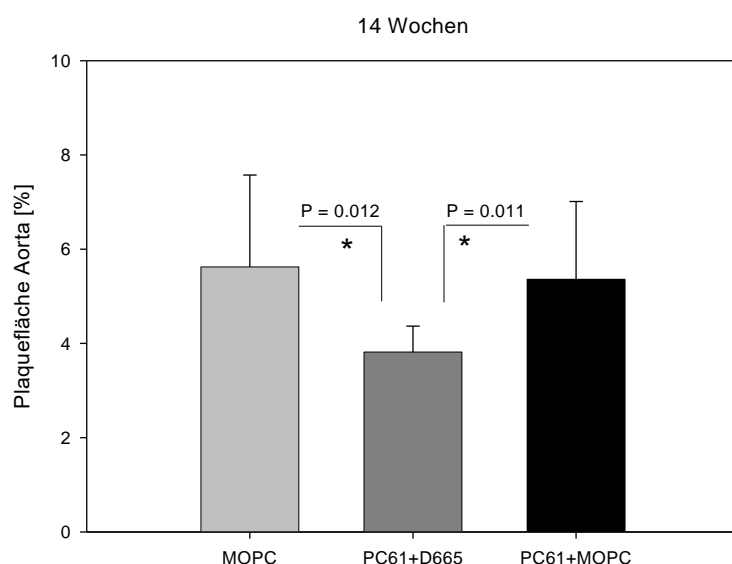


Abb. 13: Plaquerfläche Aorta nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion

Prozentuale arteriosklerotische Plaquerfläche der Aorta im Verhältnis zur Aortengesamtfläche von weiblichen ApoEko-Mäusen im Alter von 14 Wochen nach 8 Wochen „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion des T_{reg} -depletierenden Antikörpers PC61, jeweils gefolgt von Injektion des CD28 Superagonisten D665 bzw. MOPC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und der P-Wert des Student's T-Test „P“. Tierzahl pro Gruppe N = 10 / 10 / 11.

3.4.2 FACS-Analyse von Blut und Milz

Bei denselben Versuchstieren wurden in Versuchswoche 2, 6 und 8 ab Beginn der „western-type“ Diät FACS-Analysen des Blutes und in Woche 8 der Milz durchgeführt. Die Angabe der Zellzahlen im Text erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Tieranzahl wird im Folgenden mit „N“, die statistische Berechnung mit dem Student's T-Test mit „P“ abgekürzt.

Bei der Untersuchung des Anteils der CD4+FoxP3+ Zellen im Blut fiel eine durchgehend signifikante Amplifikation dieser Zellen durch den Antikörper D665 nach vorheriger Depletion mit PC61 in Woche 2 (2,40% \pm 1,87 der Lymphozyten; N = 6; P = 0,006) und Woche 6 (1,82% \pm 0,89 der Lymphozyten; N = 10; P = 0,001) gegenüber den mit PC61+MOPC nur T_{reg}-depletierten Tieren auf (Woche 2: 0,6% \pm 0,32 der Lymphozyten, N = 11; Woche 6: 0,50% \pm 0,35 der Lymphozyten, N = 9). Gegenüber der mit MOPC injizierten Kontrollgruppe (Woche 2: 1,24% \pm 0,41 der Lymphozyten, N = 7, P = 0,136; Woche 6: 1,08 \pm 0,62 der Lymphozyten, N = 10, P = 0,046) zeigte sich ebenfalls eine Amplifikation der CD4+FoxP3+ Zellen durch Injektion mit PC61+D665. Durch Injektion mit PC61+MOPC wurde in Woche 2 (P = 0,002) und Woche 6 (P = 0,024) eine signifikante Verminderung der CD4+FoxP3+ Zellen gegenüber der Kontrollgruppe erreicht. In Versuchswoche 8, drei Wochen nach letzter D665 Injektion, zeigten sich keine Unterschiede mehr zwischen den drei Versuchsgruppen. Der Prozentsatz der CD4+FoxP3+ Zellen sank nach PC61+D665-Injektion kontinuierlich und signifikant von Woche 2 nach Woche 8 (P = 0,02) und von Woche 6 nach Woche 8 (P = 0,005). (siehe unten, Abbildung 14)

In der Analyse der CD25+FoxP3+ Zellen zeigte sich eine signifikante Amplifikation dieser Zellen nach Injektion mit PC61+D665 (Woche 2: 1,93% \pm 1,49 der Lymphozyten, N = 6, P = 0,013; Woche 6: 1,35% \pm 0,71 der Lymphozyten, N = 10, P = 0,009) gegenüber der mit PC61+MOPC depletierten Gruppe (Woche 2: 0,63% \pm 0,33 der Lymphozyten, N = 11; Woche 6: 0,57% \pm 0,51 der Lymphozyten, N = 11). Mittels PC61+MOPC-Injektion allein wurde der Anteil der CD25+FoxP3+ Zellen gegenüber der Kontrolle in Woche 2

Ergebnisse

($P = 0,027$) signifikant reduziert. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen der Injektion mit PC61+D665 und der Kontrolle in Woche 2, 6 und 8 bei allen untersuchten Parametern. Der Prozentsatz der CD25+FoxP3+ Zellen sank nach PC61+D665-Injektion kontinuierlich und signifikant von Woche 2 zu Woche 8 ($P = 0,039$) und von Woche 6 zu Woche 8 ($P = 0,017$). (siehe unten, Abbildung 15)

Auch bei der Untersuchung des Anteils der FoxP3+ Zellen an den CD4+ Zellen gesamt zeigte sich eine signifikante Zunahme der FoxP3+ Zellen durch die Antikörper PC61+D665 (Woche 2: $16,45\% \pm 13,45$, $N = 6$, $P = 0,005$; Woche 6: $19,91\% \pm 8,71$, $N = 6$, $P = 0,001$) gegenüber der PC61+MOPC-Gruppe in Woche 2 ($3,29\% \pm 1,70$, $N = 11$) und Woche 6 ($3,71\% \pm 2,22$, $N = 7$) und gegenüber der Kontrolle in Woche 6 ($5,81\% \pm 3,32$, $N = 5$, $P = 0,008$). In Woche 2 war eine signifikante Reduktion dieser Zellen durch den Antikörper PC61+MOPC ($3,29\% \pm 1,70$, $N = 11$, $P = 0,008$) gegenüber der Kontrollgruppe ($6,69\% \pm 2,35$, $N = 4$) zu erkennen. Auch hier kam es wie bei den anderen Zellreihen zu einem kontinuierlichen Sinken des Prozentsatzes der FoxP3+ Zellen an den CD4+ Zellen nach PC61+D665-Injektion von Woche 2 zu Woche 8 ($P = 0,039$) und von Woche 6 zu Woche 8 ($P = 0,001$). (Siehe unten, Abbildung 16)

Ergebnisse

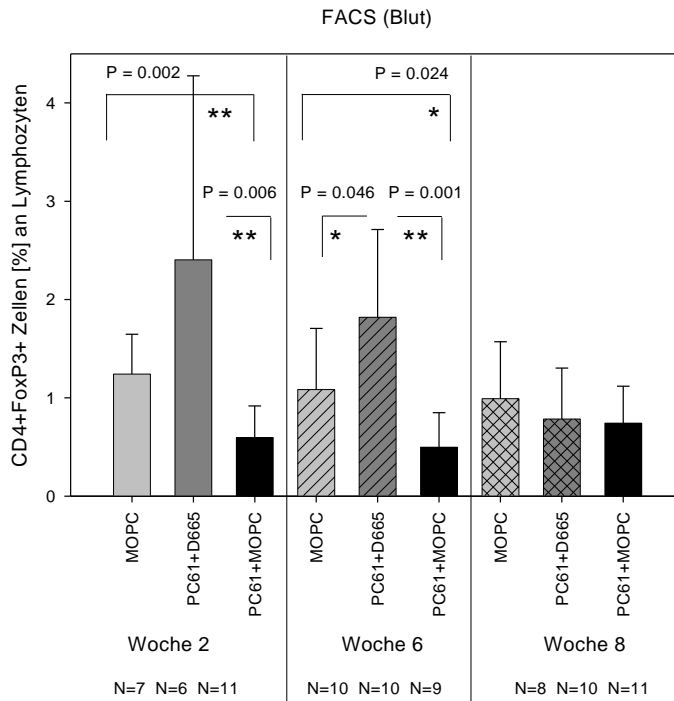


Abb. 14: FACS-Analyse (Blut): CD4+FoxP3+ Zellen nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion in Woche 2, 6, 8

FACS-Analyse des Blutes weiblicher ApoEko-Mäuse unter „western- type“ Diät und zweimaliger Injektion des Antikörpers PC61 und jeweils eine Woche später des Antikörpers D665 bzw. MOPC. FACS-Analyse in Versuchswoche 2/6/8. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD4+FoxP3+ Zellen an den Lymphozyten sowie die Anzahl der Tiere „N“.

Signifikanter Unterschied (*P < 0,05, **P < 0,01)

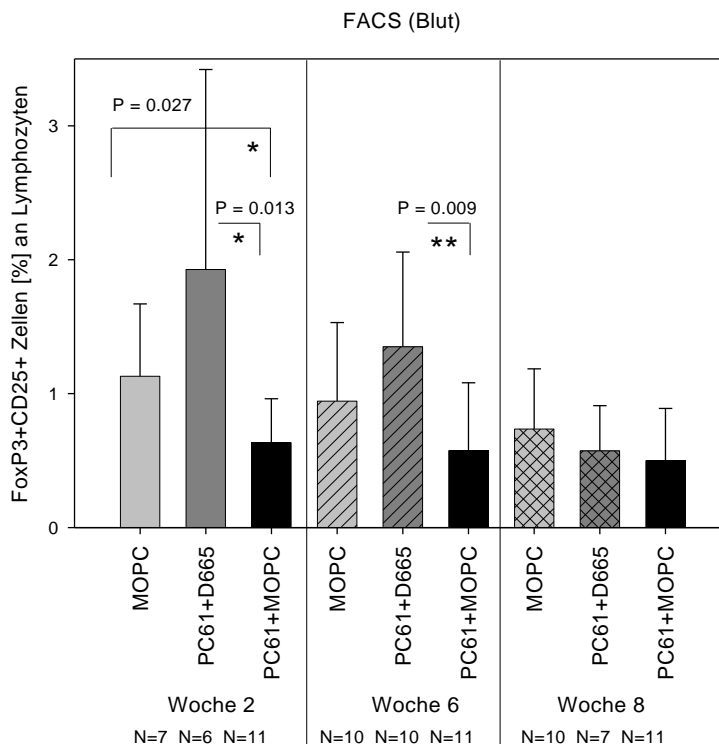


Abb. 15: FACS-Analyse (Blut): FoxP3+CD25+ Zellen nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion in Woche 2, 6, 8

FACS-Analyse des Blutes weiblicher ApoEko-Mäuse unter „western- type“ Diät und zweimaliger Injektion des Antikörpers PC61 und jeweils eine Woche später des Antikörpers D665 bzw. MOPC. FACS-Analyse in Versuchswoche 2/6/8. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der FoxP3+CD25+ Zellen an den Lymphozyten sowie die Anzahl der Tiere „N“.

Signifikanter Unterschied (*P < 0,05, **P < 0,01)

Ergebnisse

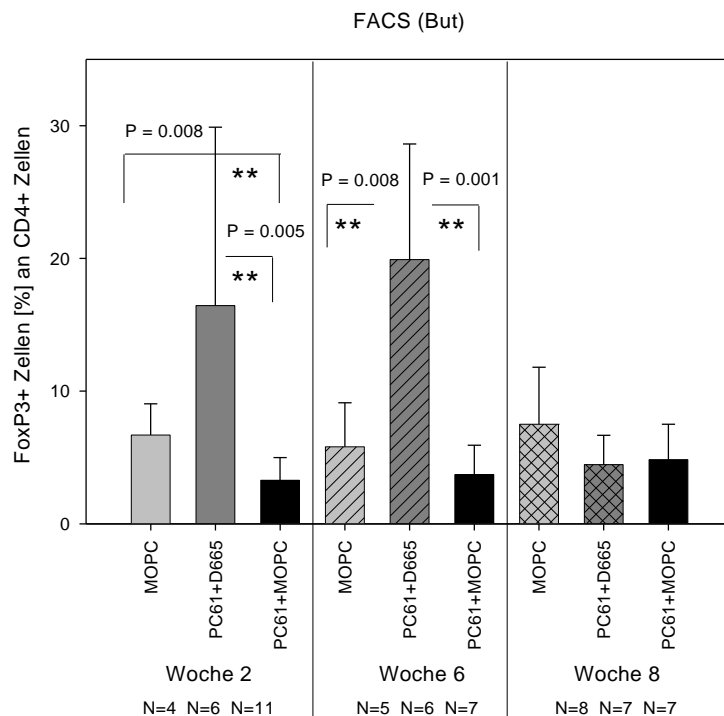


Abb. 16: FACS-Analyse (Blut): Anteil FoxP3+ an CD4+-Zellen nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion in Woche 2, 6, 8

FACS-Analyse des Blutes weiblicher ApoEko-Mäuse unter „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion des Antikörpers PC61 und jeweils eine Woche später des Antikörpers D665 bzw. MOPC. FACS-Analyse in Versuchswoche 2/6/8. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der FoxP3+ Zellen an CD4+ T-Zellen sowie die Anzahl der Tiere „N“.

Signifikanter Unterschied (**P < 0,01)

In der FACS-Analyse der Milz in Versuchswoche 8 zeigte sich ein deutlicher Trend zur Amplifikation der CD4+FoxP3+ Zellen nach Injektion mit den Antikörpern PC61+D665 (3,59% ± 0,59 der Lymphozyten, N = 10) gegenüber der mit PC61+MOPC T_{reg}-depletierten Gruppe (2,90% ± 0,96 der Lymphozyten, N = 10; P = 0,067) und zur Erhöhung dieser Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (2,94% ± 0,96 der Lymphozyten; N = 10; P = 0,086).

Die CD25+FoxP3+ Zellen wurden durch Injektion mit PC61+D665 (2,92% ± 0,49; N = 10) signifikant gegenüber den nur mit PC61+MOPC (2,11% ± 0,95; N = 10; P = 0,026) injizierten Tieren erhöht. Keine Veränderungen zeigten sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe (2,67% ± 0,68; N = 10, P = 0,352).

Es fiel ein Trend auf zur Steigerung des Anteils der FoxP3+ Zellen an den CD4+ Zellen durch Injektion mit den Antikörpern PC61+D665 (19,37% ± 7,33; N = 9) im Vergleich zu den mit PC61+MOPC allein injizierten Tieren (15,14% ± 6,38; N = 10; P = 0,174) und im Vergleich zur Kontrollgruppe (14,85% ± 4,45; N = 10, P = 0,115).

Ergebnisse

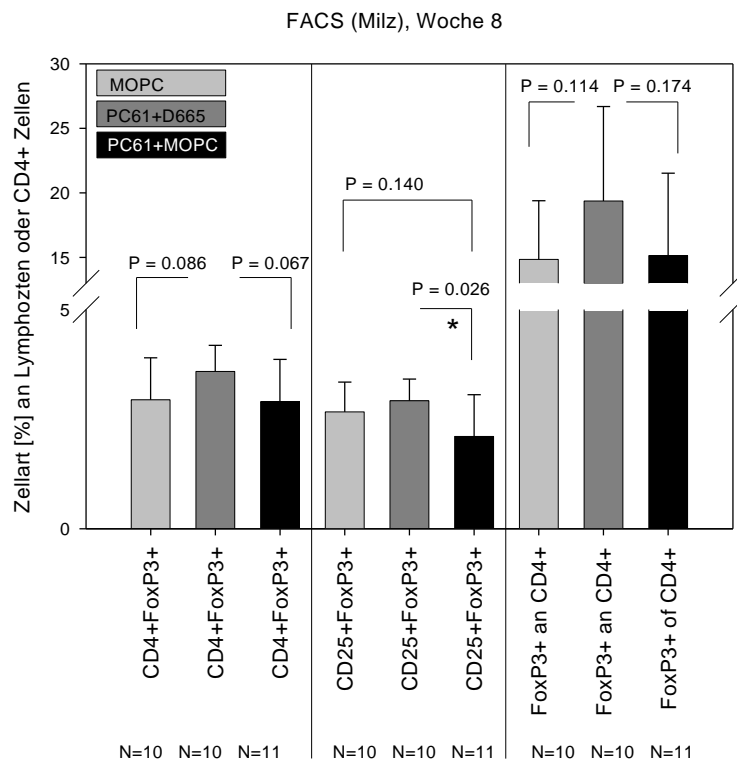


Abb. 17: FACS-Analyse (Milz) PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion in Woche 8

FACS-Analyse der Milz weiblicher ApoEko-Mäuse unter „western-type“ Diät nach zweimaliger Injektion des Antikörpers PC61 und jeweils eine Woche später des Antikörpers D665 bzw. MOPC. FACS-Analyse in der 8. Versuchswoche. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellen an Lymphozyten bzw. CD4+ T-Zellen sowie die Anzahl der Tiere „N“.

Signifikanter Unterschied (*P < 0,05)

Zusammengefasst zeigten die FACS-Analysen von Blut und Milz, dass die alleinige Injektion mit PC61+MOPC zu einer transienten Reduktion der regulatorischen T-Zellen führte und dass durch den CD28 Superagonisten D665 eine transiente Amplifizierung dieser T_{reg} erreicht wurde.

3.4.3 Gewicht

Bei den oben genannten weiblichen ApoEko-Mäusen zeigte sich eine signifikante Gewichtszunahme der nur mit PC61+MOPC T_{reg} -depletierten Tiere ($26,35g \pm 2,58$, $N = 11$) gegenüber der Kontrollgruppe ($23,92g \pm 1,58$, $N = 10$, $P = 0,02$) und der mit PC61+D665 injizierten Gruppe ($23,90g \pm 2,13$, $N = 10$, $P = 0,03$). Zwischen der mit PC61+D665 injizierten Gruppe und der Kontrollgruppe zeigte sich kein Unterschied.

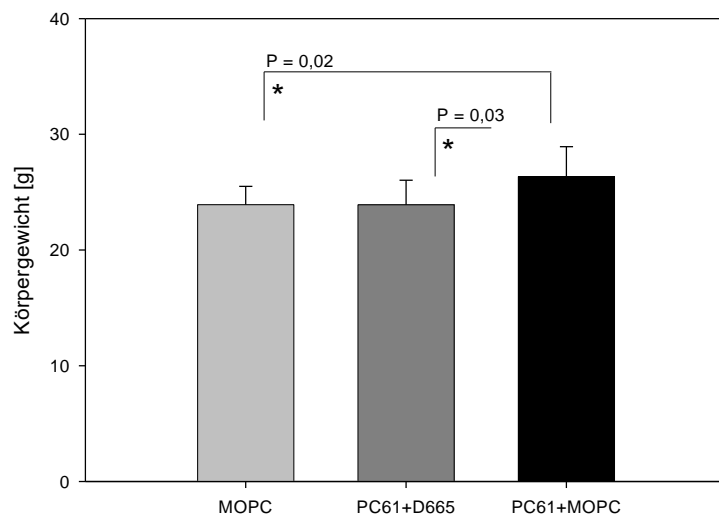


Abb. 18: Körpergewicht nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion.

Körpergewicht [g] von weiblichen ApoEko-Mäusen im Alter von 14 Wochen nach 8 Wochen „western-type“ Diät und zweimaliger Injektion des T_{reg} -depletierenden Antikörpers PC61 und jeweils eine Woche später des CD28 Superagonisten D665 bzw. MOPC. Tierzahl pro Gruppe $N = 10 / 10 / 11$

* Signifikanter Unterschied (* $P < 0,05$)

4 DISKUSSION

4.1 Rolle regulatorischer T-Zellen in der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist ein multifaktorielles Geschehen, in dem eine Vielfalt von endogen und exogen induzierten immunologischen, autoimmunen, entzündlichen und infektiologischen Faktoren zum Tragen kommt. Regulatorische T-Zellen spielen dabei eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass mit Hilfe eines CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpers eine Modulation regulatorischer T-Zellen in ApoEko-Mäusen möglich ist und die Arterioskleroseprogression dadurch signifikant vermindert werden kann.

In bisherigen Versuchen bezüglich der Arteriosklerose wurden T_{reg} aus kongenen Donoren isoliert und dann transplantiert. Als Alternative amplifizierten andere Gruppen endogene T_{reg} in vivo durch den Antikörper D665 und konnten Erfolge in Bereichen der Autoimmunität, Entzündung und Transplantation nachweisen. So zeigte sich in Nagetieren der Antikörper D665 hocheffektiv in der Behandlung von bestimmten Autoimmunerkrankungen (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, experimentelle Autoimmunneuritis, Diabetes)[84, 98, 132, 139, 140], Entzündungsreaktionen (adjuvante Arthritis, Glomerulonephritis, TNF-induzierte Knochenzerstörung, Trypanosomiasis assoziierte Entzündung),[141-144] und ungewollten T-Zell Reaktionen bei Transplantationen von soliden Organen [145-147] sowie Stammzellen.[148, 149]

Ein erster Phase I Versuch im Menschen mit der menschspezifischen Variante des Antikörpers D665 (TGN1412) in gesunden menschlichen Probanden führte 2006 zu lebensbedrohlichen Zytokin-Stürmen.[150] Die Ursachen wurden umfangreich untersucht. Nach Anpassung der Dosis und Co-Administration von Kortikosteroiden zeigte ein weiterer Phase I Versuch an gesunden menschlichen Probanden eine signifikante Aktivierung und Expansion der Treg ohne signifikante Zytokinfreisetzungen.[151] Ein Phase IB Versuch an Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte laut Hersteller von TAB08 (Equivalent zu TGN1412)

Erfolge in der Krankheitsschwere und keine Zytokinstürme. Ein Phase II Versuch ist in Vorbereitung und geplant für Sommer 2015.[152]

In den vorliegenden Versuchen wurde nun erstmals die Wirkung endogener, mittels Antikörperstimulation induzierter regulatorischer T-Zellen auf die Arterioskleroseentwicklung untersucht. Der T_{reg}-amplifizierende Effekt des CD28 Superagonisten D665 und der T_{reg}-depletierende Effekt des Antikörpers PC61 wurden mittels FACS-Analysen von Blut- und Milzzellen bestätigt.

4.1.1 Alleinige Stimulation regulatorischer T-Zellen in der naiven ApoEko-Maus zeigt keinen Nutzen bezüglich Arteriosklerose

ApoEko-Mäusen wurde unter atherogener „western-type“ Diät (im Alter von dreizehn und siebzehn Lebenswochen) der T_{reg}-amplifizierende CD28-spezifische superagonistische monoklonale Antikörper D665 bzw. die Kontrolle (MOPC) injiziert. Im Alter von 21 Wochen fand nach insgesamt 8 wöchiger „western-type“ Diät die Organentnahme statt. Obwohl in diesen Versuchen die T-Zell Amplifikation mittels FACS-Analysen stabil nachgewiesen werden konnte, zeigte die Planimetrie der Aorta keine signifikante Reduktion der Arteriosklerose. Ebenso zeigte sich kein Unterschied in der Gewichtsentwicklung und dem Gesamtcholesteringehalt im Blut beider Gruppen.

Ein möglicher Grund für den ausbleibenden Effekt des Antikörpers D665 auf die Plaqueentwicklung ohne vorhergehende T_{reg}-Depletion könnte das bereits fortgeschrittene Stadium der Arteriosklerose bei Injektion und Plaqueanalyse sein. Verglichen mit Versuchen von Veillard et al.[49] hat die Entwicklung der Arteriosklerose bezüglich aktiver Zellkomponenten schon vor erster Antikörperinjektion ihre größte Aktivität erreicht und ein chronisches Stadium begonnen. Ab einem Alter von 10 Wochen haben Veillard et al. bereits eine Abnahme atheroprotektiver T_H2-Zellen festgestellt bei bis dahin progredienter Zunahme atherogener T_H1-Zellen. Nach Woche 10-14 konnten sie keine weitere Zunahme der Entzündungsmediatoren feststellen, bei jedoch weiter progredienten Läsionen.[49] Proatherogene Faktoren scheinen das Plaquegeschehen von diesem Zeitpunkt an zu dominieren.

Diskussion

Durch Inhibition der T_H1 -Zellen zu Gunsten der T_H2 -Zellen sollte eine Reduktion der Plauefläche erreicht und das zelluläre Gleichgewicht wieder in Richtung Atheroprotektion verlagert werden. Trotz zweimaliger Boosterung der T_{reg} wurde in diesem Stadium jedoch kein Vorteil bezüglich der Plaueentwicklung erreicht. Das Gleichgewicht der atheroprotektiven und atherogenen Faktoren schien bei Injektionsbeginn schon zu weit in Richtung der Atherogenese verschoben gewesen zu sein, sodass T_{reg} allein dies nicht mehr verhindern konnten.

Ait-Oufella et al. haben durch externen T_{reg} -Transfer in immunkompromittierte ApoEko/Rag2ko-Mäuse im Alter von 8 Wochen, gefolgt von 6 Wochen atherogener Diät, erfolgreich eine signifikante Reduktion der Plauefläche nachweisen können.[39] Mor et al. konnten zeigen, dass die Anzahl der T_{reg} in alten ApoEko-Mäusen verglichen mit Jungtieren signifikant geringer ist.[106] Der fehlende Effekt von D665 auf die Plaueentwicklung trotz Boosterung endogener T_{reg} könnte demnach durch das bereits fortgeschrittene Stadium der Arteriosklerose und eine mit zunehmendem Alter verminderte Reaktionsfähigkeit des Immunsystems begründet werden.

Die Wirksamkeit des CD28 Superagonisten D665 bezüglich Amplifizierung der T_{reg} wurde in dieser Arbeit mehrfach mittels FACS-Analysen belegt. In Versuch B konnte ein signifikanter Anstieg der T_{reg} im Blut nach vorheriger Depletion mit PC61 bewiesen werden. Insbesondere bei zeitnaher T_{reg} -Bestimmung nach Injektion konnten signifikante Zunahmen dieser Zellgruppe beobachtet werden, dies auch repetitiv.

Legrand et al. konnten 2006 nachweisen, dass der Effekt des Antikörpers D665 auf die T_{reg} nach jeder Boosterung nur transient ist und die Wirksamkeit des Antikörpers bei repetitiver Injektion abnimmt.[153] Dies zeigte sich auch in den Versuchen dieser Arbeit. Lin et al. dokumentierten, dass durch D665 stimulierte CD4+CD25+ T_{reg} expandieren und ihre Aktivität insgesamt noch mindestens 3 Wochen andauert, sie ihre höchste Aktivität aber nach ca. 3 Tagen erreichen.[85] Durch D665 lassen sich bereits aktivierte T_{reg} restimulieren und CD25- T-Zellen stark aktivieren. Sie produzieren dann viel IL-2,[85] welches wiederum ein Wachstumsfaktor für die T_{reg} ist. Langenhorst et al. zeigte 2012, dass die durch

den CD28 Superagonisten transient aktivierten T_{reg} das Muster ihres Migrationsrezeptors ändern und sich damit von Lymphknoten-Suchenden zu Entzündungsherd-Suchenden T_{reg} verändern.[154] Im arteriosklerotischen Gewebe können diese T_{reg} vermutlich länger wirken, auch wenn sie im Blut nicht mehr nachweisbar sind. Trotzdem zeigte sich in diesem Versuch keine Reduktion der Arteriosklerose. Möglicherweise besitzen alte Mäuse schon T_{reg} in ausreichender Sättigung, so dass selbst eine weitere Stimulation durch D665 keinen sichtbaren Effekt zeigt.

4.1.2 Alleinige Suppression regulatorischer T-Zellen führt nicht zur Progression der Arteriosklerose

In Annahme der Hypothese, dass T_{reg} atheroprotektiv sind, sollte eine Depletion dieser Zellen eine Zunahme der Plauefläche bewirken. Durch Injektion der ApoEko-Mäuse mit dem CD25+-depletierenden Antikörper PC61 konnte in dieser Arbeit jedoch keine Progression der Arteriosklerose festgestellt werden.

Die Wirksamkeit des hier verwendeten Antikörpers PC61 bezüglich einer Depletion der T_{reg} konnte in dieser Arbeit mittels FACS-Analysen mehrfach belegt werden. PC61 führte zu einer signifikanten Depletion der FoxP3+CD25+ und CD4+FoxP3+ T_{reg} gegenüber der Kontrollgruppe sowohl im Versuch zur Dosisfindung (Versuch D), wie auch im Hauptversuch (Versuch B). Trotz dieser nachweisbaren T_{reg} -Depletion kam es jedoch nicht zu einer Plaue-Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Vergleich zeigten Ergebnisse von Ait-Oufella et al.[39] eine Progression der Arteriosklerose in mit PC61 T_{reg} -depletierten ApoEko-Mäusen. Ihr Versuchsaufbau stimmte zeitlich mit dem hier vorliegenden überein, jedoch wurde eine individuelle Chow-Diät (Standard Mäusefutter, enthält weniger Fett) anstelle der proatherogenen „western-type“-Diät gefüttert und männliche Mäuse verwendet anstelle von weiblichen.

Mittels ähnlicher Versuche wie den hier durchgeführten haben Ait-Oufella et al. einen T_{reg} -Mangel simuliert. Nach Transfer von CD28^{-/-}CD4+CD25^{-/-} Splenozyten (also T_{reg} -defizient) in immundefiziente ApoEko/Rag2ko-Mäuse konnten sie eine

Diskussion

Progredienz der Arteriosklerose im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie vermehrtes Auftreten anderer Autoimmunerkrankungen wie Kolitiden, Dermatitis und Splenomegalien nachweisen. Nach Transfer von Wildtypsplenozyten oder CD4+CD25+ T_{reg} waren die Mäuse gesund und hatten weniger Arteriosklerose. In einem anderen Versuch kam es nach T_{reg}-Depletion durch PC61 zu einer signifikanten Zunahme der Plaqueentwicklung sowie der CD3+ Zellen innerhalb der Läsionen.[39] Transfer von CD4+ T-Zellen in immundefiziente Mäuse wirkte bei Zhou et al. atherogen.[155] Diese Versuche deuten darauf hin, dass eine Art leicht verletzbare Homöostase vorliegt, die durch Schwankungen der zellulären Zusammensetzung aus dem Gleichgewicht gebracht werden kann und durch Überwiegen atherogener Zelltypen zu Veränderungen am Endorgan führt. In Organismen mit zusätzlichen Pathologien und weiteren arteriosklerotischen Risikofaktoren (z.B. genetische Defekte wie ApoEko, atherogene Diät) scheint die Rolle der T_{reg} noch durch weitere, unbekannte Faktoren mit beeinflusst zu werden.

In den vorliegenden Versuchen wurden nur weibliche ApoEko-Mäuse untersucht. In der Interpretation der Versuche sind aber möglicherweise geschlechtsspezifische Unterschiede zu beachten. Surra et al. konnten 2010 zeigen, dass ApoEko-Mäuse mit verschiedenen genetischen Hintergründen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entwicklung der Arteriosklerose zeigen. Nur weibliche Tiere mit atherogenem genetischen Hintergrund unter fettreicher Diät zeigten eine signifikante Progression der Arteriosklerose im Vergleich zu einem weniger atherogenen Genotyp unter gleicher Diät, während in den männlichen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied zu erheben war.[156] Ait-Oufella untersuchte die PC61-Wirkung in männlichen Mäusen, den CD28^{-/-}CD4+CD25^{-/-} Splenozyten-Transfer in Knochenmark ablatierten Weibchen.[39] In beiden Versuchen konnten proatherogene Effekte nachgewiesen werden. Die Möglichkeit geschlechtsspezifischer Unterschiede sollte in weiterführenden Versuchen genauer beobachtet werden.

Die Mäuse in der vorliegenden Arbeit waren nach T_{reg}-Depletion signifikant schwerer als die ihrer Kontrolle, ein Hinweis auf einen unterschwellig trotz allem

fortschreitenden Krankheitsprozess. Nimmt man an, dass bei erhöhtem Gewicht auch erhöhte Blutfette als Risikofaktor für die Arteriosklerose vorliegen, wäre allerdings eine Plaquezunahme zu erwarten.[4, 155] Im Versuch A (s. o.) wurden nach zweimaliger Injektionen mit D665 die Cholesterinwerte verglichen. Hier zeigte sich kein Unterschied im Gesamtcholesterin. Eine genaue Fettstoffwechselanalyse sollte in weiteren Versuchen auch nach PC61-Injektion folgen. Geht man wie oben beschrieben von einem sich langsam entwickelnden Prozess der Arterioskleroseentstehung aus, könnten signifikante Unterschiede auch erst bei längerer Versuchsdauer nachweisbar werden. Demnach könnten stabile Versuchsbedingungen und kurze Versuchszeiträume den fehlenden Unterschied in der Plaqueentwicklung begründen. Hinweise auf klinisch sichtbare Autoimmunerkrankungen oder Entzündungsreaktionen ergaben sich in den Versuchen dieser Arbeit nicht.

Die hier vorgestellten Versuche suggerieren, dass die Treg Depletion in ApoEko-Mäusen mit atherogener Diät zum untersuchten Zeitpunkt keinen Einfluss auf die arteriosklerotische Plaqueentwicklung hat. Möglicherweise lagen aber geschlechtsspezifische Unterschiede und/oder ein zu kurzer Versuchszeitraum vor, die diese unterschiedlichen Ergebnisse bedingten.

4.1.3 Erfolgreiche Reduktion der Plaquefläche durch Stimulation zuvor T_{reg}-depletierter ApoEko-Mäuse

Der Versuch B untersuchte die Wirkung des CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpers D665 nach vorheriger Depletion der regulatorischen T-Zellen durch den CD25+-depletierenden Antikörper PC61. ApoEko-Mäuse wurden im Alter von 6 Wochen auf „western-type“ Diät gesetzt und zusätzlich zum gleichen Zeitpunkt eine Reduktion der T_{reg} durch PC61 zur stärkeren Arterioskleroseinduktion durchgeführt. Darauf folgte eine Woche später die „protektive“ Injektion des Antikörpers D665 zur Amplifikation der T_{reg} zur Therapie der Arteriosklerose. Durch Injektion mit D665 nach vorheriger Depletion der T_{reg} zeigte sich eine signifikante Minderung der Plaquefläche in der Aorta um 28,73% gegenüber der mit PC61+MOPC allein injizierten Gruppe und um 32,02% gegenüber der Kontrollgruppe. Die Wirksamkeit beider Antikörper konnte

mittels FACS-Analysen belegt werden. PC61 depletierte die CD4+FoxP3+ T_{reg} signifikant in Woche 2 und 6 gegenüber der MOPC Kontrolle, sowie die FoxP3+CD25+ Zellen (also die aktivierten T_{reg}) signifikant in Woche 2. D665 bewirkte in diesem „Toleranz-kompromittierten“ Tier, trotz des oben beschriebenen kurzzeitigen Effekts, eine erneute signifikante Amplifikation der CD4+FoxP3+ und FoxP3+CD25+ Zellen sowie des Anteils der FoxP3+ an CD4+ Zellen in Woche 2 und 6 gegenüber PC61. Diese zellulären Effekte korrelierten zudem umgekehrt mit dem Plaquewachstum. Wie Langenhorst et al. publiziert haben, suchen durch D665 stimulierte Treg Entzündungsherde auf und können in das Gewebe übertreten.[154] Der Effekt des Antikörper D665 auf das Plaquewachstum hält damit vermutlich länger an als im Blut mittels FACS-Analysen nachweisbar.

Die signifikante Minderung der Plaquefläche nach T_{reg}-Boosterung durch D665 im Vergleich zu der mit PC61 T_{reg}-depletierten Gruppe zeigt eine deutliche Mitbeteiligung der T_{reg} im Plaquegeschehen. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Versuche von Ait-Oufella et al., die nach einmaligem CD28+CD4+CD25+ Splenozyten-Transfer in immunkompromittierte weibliche ApoEko/Rag2ko-Mäuse eine Abnahme der Plaquefläche nachwiesen. Ait-Oufella beobachtete in Versuchen nach alleiniger T_{reg}-Depletion die o.g. Plaqueprogredienz sowie eine deutliche Zunahme von CD3+ T-Zellen innerhalb der Läsion.[39] In weiteren Versuchen sollte eine MOPC+D665-Gruppe angeschlossen werden, um die Wirkung des CD28 Superagonisten im nicht Treg-depletierten Mausmodell besser vergleichen zu können.

4.2 Impfung gegen Arteriosklerose?

Die Entdeckung, dass die Arteriosklerose ein chronisch inflammatorischer Prozess mit ausgeprägten immunologischen Komponenten ist, eröffnet neue immuntherapeutische Behandlungsstrategien. Dies vor allem vor dem Hintergrund, dass die bisherigen Therapieerfolge zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse noch nicht befriedigend sind. Durch die Reduktion von Risikofaktoren und mit Hilfe medikamentöser Therapien wie zum Beispiel Statinen kann das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nur um ca. 40%

Diskussion

gemindert werden.[50] Mit immuntherapeutischen Behandlungsansätzen hingegen hofft man, schon durch Prävention weit höhere Risikoreduktionen zu erreichen.

Im hier untersuchten T_{reg} defizienten ApoEko-Mausmodell wurde die arteriosklerotische Läsionsfläche signifikant vermindert. Dies erfolgte mittels eines speziellen CD28 spezifischen superagonistischen Antikörpers, der zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen führte. Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen hat dieser Antikörper bereits zur Milderung der Erkrankungen geführt. Dieser Sachverhalt könnte somit insbesondere im Hinblick auf Autoimmunerkrankungen interessant werden, die mit frühzeitiger Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen einhergehen. Vor allem vor dem Hintergrund, das bei den meisten Autoimmunerkrankungen nicht ein alleinig relevantes Autoantigen identifiziert wurde, sondern mehrere verschiedene eine Rolle spielen. Solche Patienten mit z.B. Systemischem Lupus erythematodes [157, 158] oder Rheumatoider Arthritis[159-161], die Defizite in ihrer quantitativen oder qualitativen Treg-Zahl zeigen und mit einer verfrühten Arteriosklerose einhergehen, könnten von Treg Amplifizierungen profitieren. Die in-vivo Expansion und Aktivierung regulatorischer T Zellen wäre daher eine elegante Form der Immuntherapie.

Das Hauptproblem ist der multifaktorielle Ursprung der Arteriosklerose und die vielen verschiedenen mitwirkenden Antigene, die ihrerseits nicht unbedingt Arteriosklerose-spezifisch sind. So besteht bei jedem Versuch einer Immunisierung die Gefahr, andere, möglicherweise noch unbekannte [157] antigenspezifische Abläufe im Körper zu beeinflussen. Aufgrund dieser Polyvalenz birgt auch die Übertragung von Tierexperimenten auf den Menschen schwer abschätzbare Risiken wie zum Beispiel die Induktion von Autoimmunerkrankungen.

In Tiermodellen an Ratten, Mäusen und Kaninchen konnten aktive Immunisierungen gegen unterschiedliche Arteriosklerose-typische Antigene oder Antigenbestandteile eine Reduktion der arteriosklerotischen Plauefläche induzieren. So konnten Palinski et al. 1995 und Ameli et al. 1996 durch Injektion

Diskussion

von homologen LDL oder modifizierten LDL erfolgreiche Plaquereduktionen in Kaninchen nachweisen.[131, 162] Andere Gruppen wählten als Zielantigen Substrukturen des LDL, wie das ApoB-100-Peptid bzw. strukturelle Peptidsequenzen davon. Damit konnte die Arteriosklerose durch aktive Immunisierung ebenso vermindert werden wie durch passive Immunisierung mit eigens gegen sie entwickelten Antikörpern.[163-165] Klingenberg et al. immunisierten im Jahr 2010 ApoEko-Mäuse nasal mit dem p210-Peptid des ApoB-100, womit sie eine Verminderung der Arteriosklerose und Induktion regulatorischer T-Zellen nachweisen konnten.[166] Verschiedene ApoB-100-Peptidsequenzen, die mit LDL streng assoziiert sind, wurden isoliert und appliziert.[130, 164] Die Immunisierung mit Malonaldehyd (MDA)-ApoB-100 Peptiden führte zu einer Reduktion der Arteriosklerose, stabileren Plaques sowie zu einer T_{reg}-Aktivierung und T_H2-spezifischen IgG-Bildung.[163, 167, 168] Ein Vorteil dieser ApoB-Peptide als Impfstoff ist, dass sie synthetisch und spezifisch hergestellt werden können und an Trägersubstanzen und Adjuvanzen gebunden werden können. Weiter wurden spezifische rekombinante humane IgG-Antikörper gegen bestimmte Aminosäuresequenzen des Malonaldehyds in ApoB-100 (MDA-p45) hergestellt. Diese führten zu einer deutlichen Reduktion der Arteriosklerose und einem geringeren oxLDL-Anteil innerhalb der Läsion in Mäusen sowie zu einem verminderten restriktiven Remodeling nach Intimaverletzung.[165, 167] Phosphatidylcholin (PC) ist ein anderer Bestandteil des LDL und apoptotischer Zellen. Eine Immunisierung mit Phosphatidylcholin enthaltendem Streptococcus pneumoniae Impfstoff führte zu verminderter Arteriosklerose durch Bildung PC-spezifischer Antikörper.[129] Auch das atherogene Antigen Hitze-Schock-Protein 65 („hsp65“) wirkt im arteriosklerotischen Plaquesgeschehen. Harats et al. induzierten durch orale Applikation von hsp65 eine Toleranz gegen hsp65-Antikörper. Über eine Modulation der T_H-Zell-Profile in Richtung des eher atheroprotektivem T_H2 konnten sie die Arteriosklerose vermindern.[169] In weiteren Studien konnte dieser atheroprotektive Effekt von van Puijvelde et al. mit antigenspezifischer T_{reg}-Bildung und ihren antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGFβ erklärt werden.[170] Hauer et al. impften im Jahr 2007 Mäuse mit einem oral

Diskussion

applizierten DNA-Impfstoff gegen den VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), einen Rezeptor, der in der Entstehung der Arteriosklerose ebenfalls beteiligt ist und von arteriosklerotischen Endothelzellen überexprimiert wird. Sie konnten damit eine zelluläre Immunität gegen die den Rezeptor überexprimierenden Zellen aktivieren, die Angiogenese stoppen und bereits existierende arteriosklerotische Läsionen vermindern.[171]

Bisher wurde allerdings keiner der genannten Antikörper in direkter Wirkung auf den Menschen untersucht. Eine aktuell laufende Studie (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study, „CANTOS“) untersucht nun die Wirksamkeit eines monoklonalen Antikörpers am Menschen. Patienten mit Zustand nach Herzinfarkt erhalten den IL-1 β -inhibierenden monoklonalen Antikörper Canakinumab und werden evaluiert in Bezug auf die Protektion vor neuen inflammatorisch bedingten kardiovaskulären Ereignissen.[172] IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, dem multiple Rollen im Cholesterin-Kristall-induzierten atherothrombotischen Prozess zugesprochen werden.[172]

Alle genannten Versuche haben gemeinsam, dass antigenspezifische Immunantworten mit Antikörperbildung im Organismus induziert werden. Problematisch hierbei ist jedoch, dass bisher kein alleinig Arteriosklerose-spezifisches Antigen entdeckt wurde. Somit besteht die Gefahr von überschießenden oder unzureichenden Immunreaktionen bis hin zur Induktion von Autoimmunreaktionen. Aber es wurde auch deutlich, dass regulatorische T-Zellen und T_H-Zellen entscheidende Rollen im Plaquegeschehen spielen.

Ein zweiter Therapieansatz beschäftigt sich daher direkt mit der zellulär vermittelnden Ebene, den regulatorischen T-Zellen. Durch Aktivierung oder direkten Transfer von T_{reg} kann der antigenspezifische Weg umgangen werden. Hier konnten Ait-Oufella et al. durch Transfer von regulatorischen T-Zellen in T_{reg} defiziente Tiermodelle eine Reduktion der Arteriosklerose bewirken.[39]

Diskussion

Das Besondere dieser Arbeit ist, dass der Umweg über oben genannte spezifische Antigene erstmalig in Bezug auf die Arteriosklerose umgangen werden kann. Durch direkte Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen mittels des CD28 Superagonisten D665 konnte die Arteriosklerose in einem T_{reg} -defizienten ApoEko-Mausmodell signifikant gemindert werden. Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wurde die humane Variante (TGN1412, ein menschspezifischer CD28-spezifischer superagonistischer monoklonaler Antikörper) des hier verwendeten Antikörpers D665 bereits bis in Phase I klinischer Studien untersucht. In Tierversuchen an Mäusen („D665“) und Ratten („JJ316“) konnten in mehreren Studien deutliche Vorteile in der Prophylaxe und Therapie von Autoimmunerkrankungen gezeigt werden. Zytokinausschüttungen im Rahmen der T_{reg} -Aktivierung wurden ohne nennenswerte Nebenwirkungen gut von Nagern toleriert.[122, 173-175] Auch präklinische Versuche an einer speziellen, dem Menschen ähnlichen Affenart wurden gut vertragen. In Studien an gesunden menschlichen Probanden jedoch kam es zu massiven Nebenwirkungen mit schwerer Lymphopenie und einem Zytokinsturm, der bis zum Multiorganversagen führte.[150] In umfangreichen Untersuchungen wurde nach den Ursachen für diese vom Tiermodell abweichenden Ergebnisse gesucht. Es wurde herausgefunden, dass die Zytokinfreisetzung aus $CD4+$ Effektor-Gedächtniszellen erfolgte, die verwendete Affenart das CD28 Molekül auf diesen Zellen aber nicht exprimiert.[176] Die im Phase I Versuch verwendete Dosis wurde nach diesen Affenversuchen berechnet, war daher zu hoch dosiert. Junge, in extrem sauberer Umgebung gehaltene Labortiere besitzen nur wenige dieser das Molekül tragenden $CD4+$ T-Effektor-Gedächtniszellen. Selbst wenn diese aktiviert werden, scheint ihre kleine Anzahl gut von den T_{reg} zu kontrolliert werden.[177] Ein weiteres Problem war, das in Zellkulturversuchen mit zirkulierenden Lymphozyten und Monozyten das „tonische“ TCR-Signal fehlt. Dieses Signal entsteht in-vivo durch Interaktion von Zellen im Gewebe. Bei Eintritt in die Zirkulation geht es verloren. Die Stimulation durch den CD28 Superagonisten reicht ohne Mitwirkung dieses „tonischen“ Signals nicht aus um die Lymphozyten zu aktivieren. Wie herausgefunden wurde, ist in in-vitro Versuchen dieses „tonische“ Signal auch nicht vorhanden, es kann aber durch

Diskussion

spezielle Vorbereitung erzeugt werden.[178] In den vorbereitenden in-vitro Versuchen zur Wirkung des CD28 Superagonisten war dies noch nicht bekannt, die Lymphozyten wurden also trotz hoher Dosis nicht aktiviert und schütteten daher keine Zytokine aus. Ein zweiter Phase I Versuch an menschlichen Probanden mit dem CD28 Superagonisten TAB08 (Equivalent zu TGN1412) war erfolgreich: durch starke Dosisreduktion wurden nur noch T_{reg} aktiviert und expandiert. Durch Hinzufügen von Kortikosteroiden wurde keine proinflammatorischen Zytokine mehr gemessen, die T_{reg} Aktivierung aber nur partiell gehemmt.[151] Ein Phase IB Versuch mit TAB08 an Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte laut Hersteller Erfolge in der Krankheitsschwere und keine Zytokinstürme. Ein Phase II Versuch ist in Vorbereitung und geplant für Sommer 2015.[152]

Bis zur Entwicklung eines „Impfstoffes“ gegen die Arteriosklerose sind noch einige Hürden zu nehmen. Bisher wurden humane Impfstoffe gegen virale oder bakterielle „fremde“ Antigene produziert, um eine entsprechende Immunität zu induzieren. Es existiert zudem eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen körpereigene Rezeptoren gerichtet sind und vor allem im Bereich der Tumorthherapie Verwendung finden. Im Fall einer Generierung von Impfstoffen gegen körpereigene Proteine und Antigene besteht jedoch unmittelbar und ggf. auch erst im Verlauf von Jahren die Gefahr, anstelle einer Immunität und Toleranz eine Autoimmunität zu induzieren. In Bezug auf die Arteriosklerose müssen die komplexen immunologischen Mechanismen im Tiermodell und Menschen möglichst vollständig untersucht werden, was aufgrund der multifaktoriellen Genese und fehlender spezifischer Antigene eine besondere Herausforderung ist. Die Induktion von regulatorischen T-Zellen umgeht diese Problematik in eleganter Weise, indem sie eine endogene antiarteriosklerotische Immunantwort bewirkt. Jedoch ist auch hier die Gefahr von unerwarteten oder auf andere Systeme übergreifender Immunreaktionen zu beachten.

Zusammenfassend ist die Arteriosklerose ein chronisch inflammatorischer Prozess der Gefäßwand, in dem CD4+CD25+FoxP3+ regulatorische T-Zellen

Diskussion

eine wichtige Rolle spielen. Im immunkompromittierten, T_{reg} depletierten Tiermodell wurde die Läsionsfläche signifikant reduziert durch T_{reg} Amplifizierung mit dem CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörper D665. Diese Versuchsergebnisse können insbesondere für Patienten mit Autoimmunerkrankungen klinisch relevant werden, die unter verfrühter Arteriosklerose leiden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Arteriosklerose ist ein chronisch entzündlicher Prozess der Gefäßwand, in dem CD4+CD25+FoxP3+ regulatorische T-Zellen („T_{reg}“) eine atheroprotektive Rolle spielen. Durch exogenen T_{reg}-Transfer konnten andere Gruppen eine Reduktion der Arteriosklerose nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der endogenen T_{reg} durch spezielle Antikörper modifiziert, ihr Einfluss auf die Entwicklung arteriosklerotischer Plaques in ApoEko-Mäusen untersucht sowie eine mögliche Abhängigkeit dieser Wirkung vom zellulären Immunstatus des Wirts geprüft.

Im Abstand von 28 Tagen wurde weiblichen ApoEko-Mäusen zweimal der CD28-spezifische superagonistische monoklonale Antikörper D665 injiziert, um eine polyklonale Vermehrung ihrer T_{reg} anzuregen. In einer zweiten Versuchsreihe wurden endogene T_{reg} zweimal im Abstand von 28 Tagen durch Gabe eines CD25-spezifischen Antikörpers (PC61) zunächst depletiert und jeweils 7 Tage später durch D665 geboostert, um den Effekt der T_{reg} auf ein initial T_{reg} defizientes Tiermodell zu testen. Verglichen wurde mit der alleinigen Treg-Depletion durch PC61 sowie mit einem Kontrollantikörper (Isotyp-IgG, MOPC). Die Quantifizierung der Arterioskleroseentwicklung erfolgte mittels Planimetrie der Plaquesfläche der Aorta. Die Wirksamkeit der Antikörper auf die T_{reg}-Konzentrationen wurde mittels FACS-Analysen aus Blut und Milz untersucht.

Nach alleiniger T_{reg}-Amplifikation durch D665-Injektion zeigte sich kein Unterschied in der prozentualen Plaquesfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch eine alleinige Depletion mit PC61 zeigte keine Veränderungen in der Läsionsfläche. Durch Kombination beider Antikörper jedoch kam es nach T_{reg}-Depletion mittels PC61, gefolgt von T_{reg}-stimulierender D665-Behandlung, zu einer signifikanten Verminderung der prozentualen Plaquesfläche der Aorta um 32,02% im Vergleich zur MOPC Kontrolle und um 28,73% im Vergleich zur alleinigen T_{reg}-Depletion mit PC61+MOPC. Die FACS-Analysen bestätigten eine signifikante Depletion durch PC61-Injektion sowie eine signifikante Zunahme der T_{reg} eine Woche nach D665-Injektion.

Zusammenfassung

Die Stimulation regulatorischer T-Zellen in einem T_{reg} -defizienten arteriosklerotischen Tiermodell reduzierte die aortale arteriosklerotische Läsionsfläche signifikant. In der immunkompetenten ApoEko Maus jedoch bewirkte die alleinige Vermehrung oder die alleinige Depletion regulatorischer T-Zellen keine messbare Veränderung in der Plaqueentwicklung. Diese Arbeit zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit regulatorischer T-Zellen und der inflammatorischen Veränderung der Gefäßwand besteht.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Sinzinger, H., *Allgemeine Stadieneinteilung, Ätiologie und Pathogenese der Arteriosklerose*. Klinische Angiologie, ed. S. Rieger. Vol. 1. 1998, Berlin: Springer-Verlag. 1420.
2. Bundesamt, S. *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen*. Todesursachenstatistik Deutschland 2014 [cited 2014; Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HerzKreislaufErkrankungen.html;jsessionid=B920A41C1F8F578AA8203BBE04687717.cae4>.
3. Autorengruppe, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 259 ed. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 2002, Berlin, New York: de Gruyter. 1842.
4. Prasad, K., *Pathophysiology of Atherosclerosis*. 1st ed. Textbook of Angiology, ed. J.B. Chang. 2000: Springer. 1362.
5. Stoll, G. and M. Bendszus, *Inflammation and Atherosclerosis - Novel Insights Into Plaque Formation and Destabilisation*. Stroke (AHA), 2006. **37**: p. 1923-1932.
6. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**: p. 233-241.
7. Ross, R., *Pathogenesis of Atherosclerosis: Cell Biology*. 2nd ed. Vascular Medicine, ed. J.C. Loscalzo, M.A.; Dzau, V.J. 1996: Lippincott Williams&Wilkins. 1312.
8. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.
9. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.
10. Ross, R., *Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry*. Am J Pathol, 1993. **143**(4): p. 987-1002.
11. van der Wal, A.C., et al., *Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response*. Lab Invest, 1989. **61**(2): p. 166-70.
12. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(2): p. 131-8.
13. Mallat, Z., H. Ait-Oufella, and A. Tedgui, *Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(4): p. 113-8.
14. Hansson, G.K. and L. Jonasson, *The Discovery of Cellular Immunity in the Atherosclerotic Plaque*. American Heart Association, 2009. **29**: p. 1714-1717.
15. Grundtman, C. and G. Wick, *The autoimmune concept of atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol., 2011. **22**(5): p. 327-34.
16. Andersson, J., P. Libby, and G.K. Hansson, *Adaptive immunity and atherosclerosis*. Clin Immunol, 2010. **134**(1): p. 33-46.
17. Hansson, G.K., *Immune mechanisms in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(12): p. 1876-90.

18. Stemme, S., et al., *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3893-7.
19. Getz, G.S., *Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Immune function in atherogenesis*. J Lipid Res, 2005. **46**(1): p. 1-10.
20. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 297-329.
21. Matsuura E, K.K., Matsunami Y, Shen L, Quan N, Makarova M, Suchkov SV, Ayada K, Oguma K, Lopez LR., *Autoimmunity, Infectious Immunity, and Atherosclerosis*. J Clin Immunol., 2009.
22. Harats D, Y.N., Gilburd B, Shoenfeld Y, George J., *Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates Mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions*. J Am Coll Cardiol., 2002. **40**:1333–8.
23. Erkkila L, L.K., Haasio K, Tirola T, Jauhiainen M, Lehr and e.a. HA, *Heat shock protein 60 autoimmunity and early lipid lesions in cholesterol-fed C57BL/6JBom mice during Chlamydia pneumoniae infection*. Atherosclerosis, 2004. **177**:321–8.
24. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie*. 2008, Springer: Berlin Heidelberg.
25. Löffler, G., P.E. Petrides, and P.C. Heinrich, *Biochemie & Pathobiochemie*, ed. G. Löffler. Vol. 8. 2007, Berlin Heidelberg: Springer. 1266.
26. Galkina, E., et al., *Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1273-82.
27. Rekhter, M.D. and D. Gordon, *Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques*. Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 668-77.
28. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie*. Vol. 4. 2000, Berlin: Springer-Verlag.
29. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
30. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties*. Ann. Rev. Immunol., 1989. **7**: p. 145-73.
31. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
32. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.
33. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
34. George, J., *Mechanisms of disease: the evolving role of regulatory T cells in atherosclerosis*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008. **5**(9): p. 531-40.

35. Cote-Sierra, J., et al., *Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**: p. 3880-3885.
36. Le Gros, G., et al., *Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells*. J Exp Med, 1990. **172**: p. 921-929.
37. Chen, W., et al., *Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β -Induction of Transcription Factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**: p. 1875-1886.
38. Zhou, X., *CD4+ T Cells in Atherosclerosis*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2003. **57**: p. 287–291.
39. Ait-Oufella, H., et al., *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 178-80.
40. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
41. Yan, Z.H., G. K., *Innate Immunity, Macrophage Activation, and Atherosclerosis*. Immunological Reviews, 2007. **Vol. 219**: p. 187-203.
42. Gotsman, I., R. Gupta, and A.H. Lichtman, *The influence of the regulatory T lymphocytes on atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(12): p. 2493-5.
43. Whitman, S.C., et al., *Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice*. Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1819-24.
44. Ait-Oufella, H., et al., *Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(1): p. 23-33.
45. Binder, C.J., et al., *Innate and acquired immunity in atherogenesis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1218-26.
46. Gupta, S., et al., *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2752-61.
47. Niwa, T., et al., *Interferon-gamma produced by bone marrow-derived cells attenuates atherosclerotic lesion formation in LDLR-deficient mice*. J Atheroscler Thromb, 2004. **11**(2): p. 79-87.
48. King, V.L., S.J. Szilvassy, and A. Daugherty, *Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(3): p. 456-61.
49. Veillard, N.R., et al., *Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2339-44.
50. Nilsson, J., et al., *Vaccines modulating lipoprotein autoimmunity as a possible future therapy for cardiovascular disease*. J Intern Med, 2009. **266**(3): p. 221-31.
51. Neumann, J., ed. *Immunbiologie*. Immunbiologie, ed. J. Neumann. Vol. 1. 2008, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin Heidelberg. 286.
52. Abbas, A.K. and A.H. Lichtmann, *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Vol. 2. 2007: Saunders Elsevier. 324.
53. Hansson, G.K., J. Holm, and L. Jonasson, *Detection of Activated T-Lymphocytes in the Human Atherosclerotic Plaque*. American Journal of Pathology, 1989. **135**: p. 169-175.

54. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. *Arteriosclerosis*, 1986. **6**: p. 131-138.
55. Zhou, X., et al., *Lesion Development and Response to Immunization Reveal a Complex Role for CD4 in Atherosclerosis*. *Circulation Research*, 2005. **96**: p. 427-434.
56. Zhou, X., S. Stemme, and G.K. Hansson, *Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice*. *American Journal of Pathology*, 1996. **149**: p. 359-366.
57. Ammirati, E., et al., *The Role of T and B Cells in Human Atherosclerosis and Atherothrombosis*. *Clin Exp Immunol*, 2015, **179**(2): p. 173-87.
58. De Palma, R., et al., *Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism*. *Circulation*, 2006. **113**(5): p. 640-6.
59. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions*. *Cardiovasc Res*, 1995. **29**(5): p. 689-96.
60. Cheong, C. and J.H. Choi, *Dendritic cells and regulatory T cells in atherosclerosis*. *Mol Cells*, 2012. **34**(4): p. 341-7.
61. Shaposhnik, Z., et al., *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor regulates dendritic cell content of atherosclerotic lesions*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(3): p. 621-7.
62. Chistiakov, D.A., I.A. Sobenin, and A.N. Orekhov, *Regulatory T cells in atherosclerosis and strategies to induce the endogenous atheroprotective immune response*. *Immunol Lett*, 2013. **151**(1-2): p. 10-22.
63. Yilmaz, A., et al., *Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(1): p. 70-80.
64. Niessner, A. and C.M. Weyand, *Dendritic cells in atherosclerotic disease*. *Clin Immunol*, 2009. **134**(1): p. 25-32.
65. Ma-Krupa, W., et al., *Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis*. *J Exp Med*, 2004. **199**(2): p. 173-83.
66. Lan, Y.Y., et al., *"Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig*. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 5868-77.
67. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. *Immunology*, 1970. **18**(5): p. 723-37.
68. Battaglia, M., et al., *Tr1 cells: from discovery to their clinical application*. *Semin Immunol*, 2006. **18**(2): p. 120-7.
69. Vukmanovic-Stejic, M., et al., *Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(9): p. 2423-33.
70. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 531-62.

71. Chattopadhyay, S., N.G. Chakraborty, and B. Mukherji, *Regulatory T cells and Tumor Immunity*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**: p. 1153-1161.
72. Yamagiwa, S., et al., *A Role for TGF- β in the Generation and Expansion of CD4+CD25+ Regulatory T Cells from Human Peripheral Blood*. J. Immunol., 2001. **166**: p. 7282-7289.
73. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. Journal of Immunology, 1995. **155**: p. 1151-1164.
74. Kim, J., et al., *Cutting edge: Depletion of Foxp3+ cells leads to induction of autoimmunity by specific ablation of regulatory T cells in genetically targeted mice*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7631-4.
75. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
76. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
77. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 329-41.
78. Stephens, L.A. and D. Mason, *CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3105-10.
79. Apostolou, I., et al., *Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen*. Nat Immunol, 2002. **3**(8): p. 756-63.
80. Shevach, E.M., *From Vanilla to 28 Flavours: Multiple Varieties of T Regulatory Cells*. Immunity, 2006. **25**: p. 195-201.
81. Zhu, J., Paul, W., *CD4 T cells: fates, functions and faults*. Blood, 2008. **112**: p. 1557-1569.
82. Miyara, M., et al., *Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 899-911.
83. Corthay, A., *How do regulatory T cells work?* Scand J Immunol, 2009. **70**(4): p. 326-36.
84. Beyersdorf, N., et al., *Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2005. **202**(3): p. 445-55.
85. Lin, C.H. and T. Hunig, *Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist*. Eur J Immunol, 2003. **33**(3): p. 626-38.
86. Bettelli, E., Y. Carrier, and W. Gao, *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH 17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**: p. 235-238.
87. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression*. Nature, 2007. **445**: p. 766-770.

88. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
89. Ono, M., et al., *Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and CD25- regulatory T cells*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4748-56.
90. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: history and perspective*. Methods Mol Biol. **707**: p. 3-17.
91. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. Nature Immunology, 2010. **11**: p. 7-13.
92. Sharma, R. and S.T. Ju, *Genetic control of the inflammatory T-cell response in regulatory T-cell deficient scurfy mice*. Clin Immunol, 2010. **136**(2): p. 162-9.
93. Chu, K.H. and B.L. Chiang, *Regulatory T Cells Induced by Mucosal B Cells Alleviate Allergic Airway Hypersensitivity*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **46**(5): p. 651-9.
94. Karlsson, M.R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg, *Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1679-88.
95. Yamashita, H., et al., *Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model*. Allergy, 2012. **67**(2): p. 201-9.
96. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz, *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 266-71.
97. Asseman, C., S. Fowler, and F. Powrie, *Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(4 Pt 2): p. S185-9.
98. Schmidt, J., et al., *Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies*. Journal of Neuroimmunology, 2003. **140**: p. 143-152.
99. O'Connor, R.A. and S.M. Anderton, *Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease*. J Neuroimmunol, 2008. **193**(1-2): p. 1-11.
100. Joffre, O., et al., *Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 88-92.
101. Chen, W., et al., *Donor Lymphocyte Infusion Induces Long-Term Donor-Specific Cardiac Xenograft Survival through Activation of Recipient Double-Negative Regulatory T Cells1*. The Journal of Immunology, 2005. **175**: p. 3409-3416.
102. Kishikawa, H., T. Shimokama, and T. Watanabe, *Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993. **423**(6): p. 433-42.

103. Paulsson, G., et al., *Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**: p. 10-17.
104. Fiorentino, D., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells*. The Journal of Immunology, 1991. **146**: p. 3444-3451.
105. Sasaki, N., et al., *Regulatory T cells in atherogenesis*. J Atheroscler Thromb, 2012. **19**(6): p. 503-15.
106. Mor, A., et al., *Role of Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Experimental Atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**: p. 893-900.
107. Klingenberg, R. and G.K. Hansson, *Treating inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies*. Eur Heart J, 2009. **30**(23): p. 2838-44.
108. Mallat, Z., et al., *Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. Circulation, 2003. **108**(10): p. 1232-7.
109. de Boer, O.J., et al., *Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions*. PLoS ONE, 2007. **2**(1): p. e779.
110. Potekhina, A.V., et al., *CD4(+)/CD25(high)/CD127(low) regulatory T cells in patients with stable angina and their dynamics after intracoronary sirolimus-eluting stent implantation*. Hum Immunol. **72**(7): p. 553-7.
111. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
112. Chen, W. and J.E. Konkel, *TGF- β and 'Adaptive' Foxp3+ Regulatory T cells*. J Mol Cell Biol, 2010. **2**(1): p. 30-6
113. Liu, Y., et al., *A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. Nature Immunology, 2008. **9**(6): p. 632-640.
114. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell Contact-dependent Immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**: p. 629-644.
115. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. The Journal of Immunology, 2004. **172**: p. 834-842.
116. Roncarolo, M., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. Immunol Rev., 2006. **212**: p. 28-50.
117. Marie, J.C., et al., *TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells*. JEM, 2005. **201**: p. 1061-1067.
118. Papiernik, M. and A. Banz, *Natural regulatory CD4 T cells expressing CD25*. Microbes Infect, 2001. **3**(11): p. 937-45.
119. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.

120. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
121. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
122. Hunig, T. and K. Dennehy, *CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential*. Immunol Lett, 2005. **100**(1): p. 21-8.
123. Mallat, Z., et al., *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. e17-24.
124. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
125. Soskic, B., et al., *A transendocytosis perspective on the CD28/CTLA-4 pathway*. Adv Immunol, 2014. **124**: p. 95-136.
126. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
127. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
128. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
129. Binder, C., et al., *Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL*. Nature Medicine, 2003. **9**: p. 736-743.
130. Fredrikson, G., et al., *Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003. **23**: p. 879-884.
131. Palinski, W., E. Miller, and W. J.L., *Immunisation of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 821-825.
132. Beyersdorf, N., et al., *Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2005. **64**: p. iv91-iv95.
133. Tacke, M., et al., *CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28*. Eur J Immunol, 1997. **27**(1): p. 239-47.
134. Hünig, T., *Comeback bei niedriger Dosierung*. Labor&More, 2015. **2/2015**.
135. Betts, R.J., A.W. Ho, and D.M. Kemeny, *Partial depletion of natural CD4CD25 regulatory T cells with anti-CD25 antibody does not alter the course of acute influenza A virus infection*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27849.
136. Setiady, Y.Y., J.A. Coccia, and P.U. Park, *In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+ phagocytes*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 780-6.

137. Palinski, W., et al., *ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum.* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(4): p. 605-16.
138. Elflein, K., *Verstärkung und Modulation der Immunantwort der Ratte mit Hilfe eines superagonistischen, CD28-spezifischen, monoklonalen Antikörpers,* in *Universität Würzburg, Fakultät für Biologie, Institut für Virologie und Immunbiologie.* 2004, Universität Würzburg: Würzburg.
139. Beaudette-Zlatanova, B.C., et al., *Costimulation and autoimmune diabetes in BB rats.* Am J Transplant, 2006. **6**(5 Pt 1): p. 894-902.
140. van den Brandt, J., et al., *Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire.* J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2285-94.
141. Rodriguez-Palmero, M., et al., *Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody.* J Rheumatol, 2006. **33**(1): p. 110-8.
142. Miyasato, K., et al., *CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats.* Clin Exp Nephrol, 2011. **15**(1): p. 50-7.
143. Guilliams, M., et al., *Experimental expansion of the regulatory T cell population increases resistance to African trypanosomiasis.* J Infect Dis, 2008. **198**(5): p. 781-91.
144. Zaiss, M.M., et al., *Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis.* J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7238-46.
145. Urakami, H., et al., *Combination of donor-specific blood transfusion with anti-CD28 antibody synergizes to prolong graft survival in rat liver transplantation.* Transplant Proc, 2006. **38**(10): p. 3244-6.
146. Azuma, H., et al., *Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts.* Am J Transplant, 2008. **8**(10): p. 2004-14.
147. Kitazawa, Y., et al., *Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody can prevent rat cardiac allograft rejection.* J Heart Lung Transplant, 2008. **27**(4): p. 362-71.
148. Beyersdorf, N., et al., *Superagonistic CD28 stimulation of allogeneic T cells protects from acute graft-versus-host disease.* Blood, 2009. **114**(20): p. 4575-82.
149. Kitazawa, Y., et al., *Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host diseases.* Cell Transplant, 2009. **18**(5): p. 627-37.
150. Suntharalingam, G., et al., *Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.* N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 1018-28.
151. Tabares, P., et al., *Human regulatory T cells are selectively activated by low-dose application of the CD28 superagonist TGN1412/TAB08.* Eur J Immunol, 2014. **44**(4): p. 1225-36.
152. Tyrsin, D. *New mechanism of action for treatment of autoimmune diseases.* 2014; Available from: www.theramab.ru.

153. Legrand, N., et al., *Transient accumulation of human mature thymocytes and regulatory T cells with CD28 superagonist in "human immune system" Rag2^{-/-}(gamma)c^{-/-}mice*. Blood, 2006. **108**: p. 238-245.
154. Langenhorst, D., et al., *Sequential induction of effector function, tissue migration and cell death during polyclonal activation of mouse regulatory T-cells*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50080.
155. Zhou, X., et al., *Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 2919-22.
156. Surra, J.C., et al., *Sex as a Profound Modifier of Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-deficient Mice with Different Genetic Backgrounds*. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2010. **17**(7): p. 2-11.
157. Alunno, A., et al., *Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 823085.
158. Gerli, R., et al., *Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(5): p. 426-30.
159. Akrouf, R., et al., *[Increased cardiovascular risk and premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis]*. Ann Cardiol Angeiol (Paris), 2012. **61**(4): p. 267-73.
160. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 277-85.
161. Kahlenberg, J.M. and M.J. Kaplan, *Mechanisms of premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis and lupus*. Annu Rev Med, 2013. **64**: p. 249-63.
162. Ameli, S., et al., *Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(8): p. 1074-9.
163. Fredrikson, G.N., et al., *Autoantibody against the amino acid sequence 661-680 in apo B-100 is associated with decreased carotid stenosis and cardiovascular events*. Atherosclerosis, 2007. **194**(2): p. e188-92.
164. Chyu, K.Y., et al., *Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(4): p. 1982-9.
165. Strom, A., et al., *Inhibition of injury-induced arterial remodelling and carotid atherosclerosis by recombinant human antibodies against aldehyde-modified apoB-100*. Atherosclerosis, 2007. **190**(2): p. 298-305.
166. Klingenberg, R., et al., *Intranasal immunization with an apolipoprotein B-100 fusion protein induces antigen-specific regulatory T cells and reduces atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(5): p. 946-52.
167. Fredrikson, G.N., et al., *Atheroprotective immunization with MDA-modified apo B-100 peptide sequences is associated with activation of Th2 specific antibody expression*. Autoimmunity, 2005. **38**(2): p. 171-9.
168. Fredrikson, G.N., et al., *Treatment with apo B peptide vaccines inhibits atherosclerosis in human apo B-100 transgenic mice without inducing an*

- increase in peptide-specific antibodies*. J Intern Med, 2008. **264**(6): p. 563-70.
169. Harats, D., et al., *Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates Mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(7): p. 1333-8.
170. van Puijvelde, G.H., et al., *Induction of oral tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(12): p. 2677-83.
171. Hauer, A.D., et al., *Vaccination against VEGFR2 attenuates initiation and progression of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(9): p. 2050-7.
172. Ridker, P.M., et al., *Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS)*. Am Heart J, 2011. **162**(4): p. 597-605.
173. Gogishvili, T., et al., *Rapid Regulatory T-Cell Response Prevents Cytokine Storm in CD28 Superagonist Treated Mice*. PLoS ONE, 2009. **4**(2).
174. Beyersdorf, N., et al., *Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 2005. **64 Suppl 4**: p. iv91-5.
175. TeGenero AG, *TGN1412 Humanized Agonistic Anti-CD28 Monoclonal Antibody*. Investigator's Brochure, 2005. **1**.
176. Eastwood, D., et al., *Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells*. Br J Pharmacol, 2010. **161**(3): p. 512-26.
177. Gogishvili, T., et al., *Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4643.
178. Romer, P.S., et al., *Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6772-82.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak/Ab	Antikörper/Antibody
APC	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Bovine serum albumin
BSS	Balanced salt solution
B-Zellen	B-Lymphozyten
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Zirka
CD	Cluster of differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC	Dendritische Zelle
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FoxP3	Forkhead box protein 3
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor
H	Stunde
INF γ	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAG-3	Lymphocyte activation gene 3
LT α	Lymphotoxin alpha
mAk/mAb	Monoklonaler Antikörper / Monoclonal antibody
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
n/N	Number/Anzahl
mTEC	Medullary thymic epithelial cell
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PRR	Pattern recognition receptor
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TGF β	Transforming growth factor beta
T _H	T-Helfer Zelle
TLR	Toll like receptor
TNF α/β	Tumor necrosis factor alpha/beta
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
T-Zellen	T-Lymphozyten
u.v.m.	Und viele/s mehr
VCAM-1	Vascular cell-adhesion molecule 1
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation

8 ABILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung einer arteriosklerotischen Plaque mit immunologischen Zellen.....	5
Abb. 2: Möglicher Ablauf einer regulatorischen Immunreaktion.....	11
Abb. 3: Wirkprinzip des CD28 Superagonisten D665	22
Abb. 4: Versuchsaufbau (Versuch A) - zweimalige D665-Injektion.....	30
Abb. 5: Versuchsaufbau (Versuch B) - zweimalige PC61-Injektion gefolgt von D665-Injektion	31
Abb. 6: FACS-Analyse (Milz) an Tag 8 nach einmaliger D665-Injektion	36
Abb. 7: FACS-Analyse (Blut), an Tag 14 nach zweimaliger D665-Injektion	36
Abb. 8: FACS-Analyse Milz (Dosisfindung PC61).....	39
Abb. 9: FACS-Analyse Blut (Dosisfindung PC61).....	39
Abb. 10: Arteriosklerotische Plaques in der längs eröffneten Aorta nach D665-Injektion	40
Abb. 11: Plauefläche Aorta nach D665-Injektion	41
Abb. 12: Arteriosklerotische Plaques in der längs eröffneten Aorta nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC- Injektion	43
Abb. 13: Plauefläche Aorta nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion	43
Abb. 14: FACS-Analyse (Blut): CD4+FoxP3+ Zellen nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion in Woche 2, 6, 8	46
Abb. 15: FACS-Analyse (Blut): FoxP3+CD25+ Zellen nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion in Woche 2, 6, 8	46
Abb. 16: FACS-Analyse (Blut): Anteil FoxP3+ an CD4+-Zellen nach PC61+ D665- bzw. PC61+MOPC- Injektion in Woche 2, 6, 8	47
Abb. 17: FACS-Analyse (Milz) PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion in Woche 8.....	48
Abb. 18: Körpergewicht nach PC61+D665- bzw. PC61+MOPC-Injektion.....	49

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: FACS-Analyse (Blut und Milz) an Tag 3, 8 und 14 nach einmaliger D665-Injektion	37
Tab. 2: Körpergewicht und Gesamtcholesterin nach D665-Injektion	41

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Priv. doz. Dr. Peter Kuhlencordt. Ich danke ihm für das Überlassen des Themas meiner Doktorarbeit und seine Unterstützung während der Versuche und für die konstruktive Kritik bei der Evaluation der Ergebnisse.

Ich danke meiner Laborkollegin Alla Ganscher, die mir stets mit Rat zur Seite stand. Ich danke Gabriele Riehl für die gute Versorgung der Versuchsmäuse und perfekten Organisation des Laboralltags.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Hünig für sein einmaliges Engagement und seine Zuverlässigkeit, die hilfreiche konstruktive Kritik der Ergebnisse aus immunologischer Sicht und das freundliche Überlassen der Antikörper. Mein besonderer Dank gilt auch seiner Arbeitsgruppe mit Dr. Karin Elflein und Beate Geyer für die Durchführung der FACS-Analysen, sowie Dr. Niklas Beyersdorf und Dr. Tea Gogishvili für Ihre wertvolle Diskussionsbereitschaft.

Bei meinen Co-Doktoranden Padma Padmapriya, Angelika Schröttle, Eva Ostermeier, Elisabeth Bendel, Nadja Miller und Sebastian Rützel möchte ich mich für das nette Klima im Labor bedanken.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden Karoline Keller, Eva Maiweg, Jan Hennings und Dunja Demmler für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Meinen Eltern Angela und Harri Knoll, meinen Schwestern und meinem Mann danke ich von ganzem Herzen, dass sie mir in Höhen und Tiefen dieser Arbeit und weit über mein Medizinstudium hinaus stets aufmunternd und zuverlässig zur Seite standen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Mann Alexander Beck für seine Liebe, Unterstützung und stete Zuverlässigkeit bedanken.