

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Immunbiologie
Vorstand: Professor Dr. Th. Hünig

Modulation der Immunglobulinproduktion bei Ratten
mit CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Alexander Thumbs
aus Würzburg

Würzburg, November 2000

Referent: Professor Dr. Th. Hünig

Ko-Referent: Professor Dr. H.-W. Kreth

Dekan: Professor Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2001

Der Promovend ist Arzt.

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Material	12
2.1.1.	Monoklonale Antikörper zur in-vivo-Behandlung	12
2.1.2.	Antikörper zur ex-vivo-Analyse	12
2.1.3.	Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.4.	Standardlösungen, Puffer und Medien	14
2.1.5.	Standards und Kits	16
2.1.6.	Geräte	16
2.1.7.	Gebrauchsmaterialien	16
2.2.	Versuchstiere	17
2.3.	Methoden	18
2.3.1.	In vivo Applikation der monoklonalen Antikörper JJ316, JJ319 und R73	18
2.3.2.	In vivo Immunisierung mit OVA-Pertussis	18
2.3.3.	Herstellung der Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen	18
2.3.4.	Ermittlung der Zellzahl	19
2.3.5.	Serumgewinnung	19
2.3.6.	ELISPOT Assay	20
2.3.7.	ELISA	21
2.3.8.	In vitro - Produktion von Immunglobulinen und Nachweis im ELISA	22
2.3.9.	Proliferationstest	22
2.3.10.	Antikörperreinigung und -biotinylierung	23
2.3.11.	Flußzytometrie	24

3.	Ergebnisse	25
3.1.	Untersuchung der Immunglobulinproduktion bei Brown-Norway-Ratten	26
3.1.1.	Wirkung der mAk JJ316 und JJ319 bei Gabe ab der Geburt	26
3.1.2.	Einfluß von mAk JJ316, JJ319 und R73 auf erwachsene Tiere	28
3.1.3.	Effekt von JJ316, JJ319 und R73 bei älteren Tieren	31
3.1.4.	Untersuchung der Immunglobulinproduktion in vitro	34
3.2.	Untersuchung der Immunglobulinproduktion bei Lewis-Ratten	37
3.2.1.	Wirkung der mAk JJ316 und JJ319 bei Applikation ab der Geburt	37
3.2.2.	Einfluß von mAk JJ316, JJ319 und R73 auf erwachsene LEW-Ratten	42
3.2.3.	Effekt von JJ316, JJ319 und R73 bei alten LEW-Ratten	44
3.2.4.	Untersuchung des Einfluß von mAk JJ316 und JJ319 auf die Immunglobulinproduktion einzelner LEW-Ratten über drei Wochen	46
3.3.	Untersuchung der Immunglobulinproduktion bei zuvor immunisierten Ratten	51
3.3.1.	Einfluß der Antikörperbehandlung auf die antigenspezifische Immunreaktion bei immunisierten BN-Ratten	51
3.3.2.	Effekt der Antikörperbehandlung auf die antigenspezifische Immunreaktion bei immunisierten LEW-Ratten	53
3.3.3.	Einfluß der Behandlung mit mAk JJ316 auf die Zellproliferation immunisierter Tiere	56
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung	64
6.	Literaturverzeichnis	65

1. Einleitung

Das Immunsystem höherer Lebewesen setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Neben den unspezifischen Abwehrmechanismen, wie physikalische Barrieren (Haut, Schleimhäute), Phagozyten (Makrophagen, neutrophile Granulozyten), Komplementsystem, Akute-Phasen-Proteine und Natürliche Killerzellen besteht mit der adaptiven bzw. erworbenen Immunantwort ein spezifisches Abwehrsystem, welches sich im Lauf des Lebens entwickelt. Die angeborene unspezifische Immunabwehr bildet einen sofortigen, vom eingedrungenen Mikroorganismus unabhängigen Schutz gegen Erreger, ist allerdings häufig allein nicht ausreichend für eine effektive Abwehr und kann keine Gedächtnisfunktion erzeugen. Zusätzlich kommt bei Kontakt mit körperfremden Strukturen, den sogenannten Antigenen, die adaptive Immunantwort in Gang. Die dabei entstehenden Gedächtniszellen ermöglichen bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine schnellere und effektivere Abwehr des Mikroorganismus. Die Zellen der spezifischen Immunität sind die Lymphozyten [Gowans und McGregor, 1965], die sich aus Knochenmarkstammzellen entwickeln. Die weiter im Knochenmark (bone marrow) reifenden B-Lymphozyten tragen membranständige Immunglobuline als Antigenrezeptoren. Nach der Aktivierung durch Antigenkontakt differenzieren sie sich entweder zu Plasmazellen, die antigenspezifische Immunglobuline sezernieren und auf diese Weise die sogenannte humorale Immunantwort bilden, oder zu Gedächtniszellen, die bei erneutem Zusammentreffen mit dem Antigen eine schnellere Sekundärantwort ermöglichen. Daneben unterscheidet man die im Thymus reifenden T-Lymphozyten, die Träger der zellulären Immunität sind [für einen Übersichtsartikel siehe Janeway, 1995].

Nach Einwanderung der Vorläuferzellen der T-Lymphozyten in den Thymus entwickeln sich diese weiter. Durch Wechselwirkungen mit dem Thymusstroma wird die Expression von CD2 stimuliert. In der Folgezeit entwickeln sich $CD3^- CD4^- CD8^-$ Thymozyten („doppelt negative Zellen“), die sich nun in zwei Gruppen aufteilen. Ein kleiner Teil wird zu $CD3^+ CD4^- CD8^-$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, wobei in der Ratte die $\gamma\delta$ -T-Zellen $CD8^+$ sind. Die größere Zellpopulation exprimiert zunächst nur die β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TZR) - wobei auch $\gamma\delta$ -Zellen β -Ketten exprimieren können, allerdings nicht auf ihrer Oberfläche - und CD8. Im nächsten Schritt werden neben der β -Kette CD8 und CD4 gebildet („doppelt positive Zellen“) und die Umordnung der α -Kette erfolgt. Von den nun entstehenden $\alpha\beta CD3^+ CD4^+ CD8^+$ - Zellen werden etwa 90% durch Apoptose (programmierter Zelltod) eliminiert, da keine positive Selektion auf Selbst-MHC-Restriktion erfolgt. Selbst-MHC-Restriktion bedeutet, dass reife Lymphozyten auf körperfremde Peptide nur bei Präsentation über MHC (major histocompatibility complex, auf nähere Einzelheiten wird weiter unten noch eingegangen) reagieren. Die übrigen Zellen teilen sich nun in die beiden Hauptgruppen der T-Lymphozyten auf, die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen und die $CD4^+$ T-Zellen. Eine zweite wichtige Eigenschaft reifer T-Zellen ist die Selbsttoleranz, d. h. sie

dürfen nicht auf körpereigene Peptide reagieren, die ihnen über MHC präsentiert werden. Bei der klonalen Deletion werden die T-Zellen während der Reifung mit körpereigenen Strukturen in Verbindung gebracht. In diesem Stadium führt die Bindung des TZR an das Antigen zur Apoptose der Thymozyten. Durch diese negative Selektion werden vor Ausschleusung der T-Zellen in die Blutbahn und die sekundären lymphatischen Organe potentiell autoreaktive Zellen eliminiert, wobei aufgrund der Tatsache, dass nicht alle Selbstantigene im Knochenmark und Thymus vorkommen, noch immer autoreaktive Zellen heranreifen können.

Reife Lymphozyten müssen für die Abwehr von Mikroorganismen diese erkennen können. B-Zellen können Antigene über den B-Zellrezeptor in intakter Form erkennen, wohingegen T-Zellen über den TZR Fremdatigene nur in Form von Peptidfragmenten, welche an Moleküle des oben bereits erwähnten MHC gebunden sind, erkennen können [Zinkernagel et al., 1974]. Die MHC-Moleküle können in zwei Klassen (MHC-I und MHC-II) unterteilt werden, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden. MHC-I wird von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und bindet intrazellulär prozessierte Peptide, welche dann von zytotoxischen $CD8^+ \alpha\beta$ -T-Zellen gebunden werden [Monaco, 1992]. Erkennt die $CD8^+$ -T-Zelle das Peptid als fremd und erfolgt eine suffiziente Co-Stimulation, wird die Zelle abgetötet. MHC-II wird dagegen nur von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen exprimiert. Über MHC-II präsentieren diese Zellen Peptidfragmente aus endozytierten Proteinen extrazellulärer Herkunft oder von intrazellulären Erregern, die in angesäuerten Vesikeln abgebaut werden (z. B. in Makrophagen), an $CD4^+$ -T-Zellen.

Die aus dem Thymus ausgeschleusten T-Zellen werden vor ihrem ersten Antigenkontakt auch als naive T-Zellen bezeichnet. Ohne Aktivierung können sie über mehrere Jahre in der Blutbahn zirkulieren. Bei Kontakt mit einer APZ kommt es zu einer Bindung zwischen den Zellen über Interaktionen von Oberflächenmolekülen, wie etwa LFA-1 und CD2 auf den T-Zellen und ICAM-1, -2, -3 oder LFA-3 auf den APZ. Erkennt der TZR das ihm über MHC präsentierte Peptid, wird eine Konformitätsänderung von LFA-1 induziert, welche zu einer höheren Affinität für ICAM-1, -2, -3 führt, so dass eine bessere Assoziation zwischen T-Lymphozyt und APZ entsteht. Ist zusätzlich ein co-stimulatorisches Signal vorhanden, kommt es zu einer Aktivierung der T-Zelle, zur Proliferation und Differenzierung in eine sogenannte T-Effektor-Zelle.

Die alleinige Bindung zwischen dem TZR und APZ über MHC führt nicht zu einer ausreichenden Aktivierung von naiven T-Zellen und kann kein proliferatives Wachstum eines T-Zell-Klones induzieren [Bretscher und Cohn, 1970]. Eine optimale T-Zell-Antwort mit einem starken IL-2-Anstieg benötigt zusätzlich ein co-stimulatorisches Signal [Jenkins et al., 1990; Schwartz et al., 1990].

1980 wurde zuerst in Studien mit monoklonalen Antikörpern das CD28-Molekül als Differenzierungsmarker auf $CD4^+$ - und einigen $CD8^+$ -T-Zellen beschrieben [Hansen et al., 1980].

In der Folgezeit zeigte sich, dass CD28 einer der wichtigsten Rezeptoren co-stimulatorischer Signale ist [Hara et al., 1985; Damle et al. 1988, 1991; Gimmi et al., 1991]. In ersten Untersuchungen wurde das humane CD28-Molekül näher betrachtet [Hansen et al., 1980]. CD28 ist ein Transmembranprotein aus der Immunglobulinsuperfamilie und ein etwa 90kDa homodimeres Glykoprotein, welches auf ca. 80% der humanen T-Zellen exprimiert wird [Martin et al., 1986]. 134 Aminosäuren bilden eine immunglobulinartig gefaltete extrazelluläre Domäne. Die intrazelluläre Domäne ist kurz und hoch konserviert [Aruffo et al., 1987]. Es gelang, homologe cDNA von CD28 auch für Maus [Gross et al., 1990] und Ratte [Clark et al., 1992] zu klonieren. Es zeigte sich eine etwa 68%ige Übereinstimmung mit humanem CD28. Kurze Zeit später gelang es, das Mausprotein [Gross et al., 1992] und das Rattenprotein [Tacke, 1995] durch monoklonale Antikörper zu identifizieren. Weitere Experimente ergaben, dass ca. 50% der humanen CD8⁺-T-Zellen kein CD28 exprimieren [Azuma et al, 1993], wohingegen in Maus und Ratte alle peripheren $\alpha\beta$ -T-Zellen CD28 auf ihrer Oberfläche tragen. Auf allen NK-Zellen der Maus [Nandi et al., 1994] und auf etwa der Hälfte der NK-Zellen der Ratte [Tacke, 1995] wird CD28 exprimiert, wohingegen bei erwachsenen Menschen kein CD28 auf den NK-Zellen gefunden werden kann.

Natürliche Liganden des CD28-Moleküls sind die auf APZ exprimierten CD80- (ältere Bezeichnung B7-1) und CD86 (B7-2) - Moleküle [Azuma et al., 1993; Freeman et al, 1993]. CD80 und CD86 gehören beide zur Immunglobulinsuperfamilie, sind allerdings in der Aminosäuresequenz nur entfernt verwandt. Normalerweise werden CD80 und CD86 auf B-Zellen, dendritischen Zellen und IFN- γ -stimulierten Makrophagen exprimiert [Freedmann et al., 1987 und 1991; Symington et al., 1993]. Zusätzlich ist die Expression auch auf aktivierten T-Zellen induzierbar [Azuma et al., 1993]. In jüngster Zeit konnte CD86 auch auf humanen Gedächtniszellen nachgewiesen werden, welche in der Lage sind, naive T-Zellen über Co-Stimulation zu aktivieren [Jeannin et al., 1999]. Die Expression von CD80 auf APZ erfolgt auf einem niedrigen Niveau. Erst nach Aktivierung durch lösliche Faktoren (z. B. Endotoxine oder Zytokine) oder Bindung von Oberflächenmolekülen (z. B. MHC-Klasse-II) kann CD80 vermehrt nachgewiesen werden [Nabavi et al, 1992]. CD86 dagegen wird auf naiven B-Zellen und Monozyten zu einem höheren Grad als CD80 exprimiert und kann nach Aktivierung noch stärker aufgezeigt werden [Azuma et al, 1993]. Es gibt Hinweise, dass CD86 der wichtigere co-stimulatorische Ligand für CD28 ist, da anti-B7-2-Antikörper die T-Zell-vermittelte Immunantwort *in vivo* stärker blockieren als anti-B7-1-Antikörper [Hathcock et al., 1993]. Da B7-1 auch nach Aktivierung der T-Zellen exprimiert wird, dient es vielleicht als primärer Ligand für CTLA-4 (Cytolytic T-Lymphocyte associated Antigen), einem Oberflächenmolekül, welches erst nach Aktivierung der T-Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird [Freeman et al., 1992], ebenfalls von CD80 und CD86 gebunden wird und - da es die weitere klonale Expansion proliferierender T-Zellen hemmt [Walunas et al., 1994] - sehr wahrscheinlich eine antagonistische Wirkung gegenüber CD28 hat. Die Bindungsaffinität von CD80 und CD86 an ihre jeweiligen Liganden ist

gleich hoch, wobei sie CTLA-4 mit einer 10-100fach höheren Affinität im Vergleich zu CD28 binden [Linsley et al., 1991].

Naive T-Zellen können, wenn sie mit keinem Antigen in Kontakt kommen, für mehrere Jahre ruhen. In dieser Zeit kondensiert die Zelle ihr Chromatin, hat kaum Cytoplasma und es findet nur eine geringe Synthese von RNA und Proteinen statt. Trifft die Zelle auf ein spezifisches Antigen, welches ihr von einer APZ präsentiert wird und erfolgt gleichzeitig Co-Stimulation, tritt die Zelle in die G1-Phase ein und beginnt mit einer starken Synthese von IL-2 und IL-2-Rezeptor. Nach Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor wird der Zellzyklus vollendet und es entstehen aktivierte T-Zellen, die sich zwei- bis dreimal täglich teilen können, so dass sich schließlich Tausende für ein Antigen spezifische T-Zellen bilden. Die Bindung von CD28 an CD80 bzw. CD86 führt zu einer Stabilisierung der IL-2mRNA und somit zu einer um den Faktor 20-30 erhöhten Synthese von IL-2. Da gleichzeitig die Transkription von IL-2mRNA um etwa das Dreifache gesteigert wird, erhöht die Co-Stimulation über CD28 die IL-2 Konzentration um mehr als das Hundertfache und ist somit - neben anderen Faktoren [Green et al., 1994] - sehr wichtig für das T-Zell-Wachstum [Gross et al., 1992; June et al., 1987]. Eine Blockade dieses Aktivierungsweges führt zu einer verminderten T-Zell-Antwort und zu einer temporären T-Zell-Anergie [Tan et al., 1993; Van Gool et al., 1994; Harding et al., 1992], so dass - selbst bei Vorhandensein beider Aktivierungssignale - im Stadium der Anergie keine T-Zell-Proliferation auszulösen ist (siehe Diagramm 1). Diese Abschwächung der T-Zell-Antwort führt zu einer Toleranz der T-Zellen gegenüber eigenen Gewebeantigenen und verhindert so mögliche Autoreaktionen.

Durch erfolgreiche Aktivierung der Zellen mittels Antigenpräsentation und Co-Stimulation entstehen T-Effektorzellen. Bei erneutem Immunogenkontakt ist für die Effektorzellen keine Co-Stimulation mehr notwendig, ein Mechanismus, der es dem Körper z. B. ermöglicht, auch virusbefallene Zellen zu eliminieren, die nicht in der Lage sind, ein co-stimulatorisches Signal zu geben. Die Umwandlung in Effektorzellen ermöglicht durch eine Steigerung von LFA-1 und CD2 eine bessere Adhäsion an der Zielzelle. Gleichzeitig wird durch eine Änderung im TZR-Komplex ein alternatives Spleißen von CD45 induziert, was zu einem engeren Kontakt zwischen TZR und Co-Rezeptor führt und somit die Empfindlichkeit des TZR für sein spezifisches Antigen erhöht [für einen Übersichtsartikel siehe Janeway, 1995].

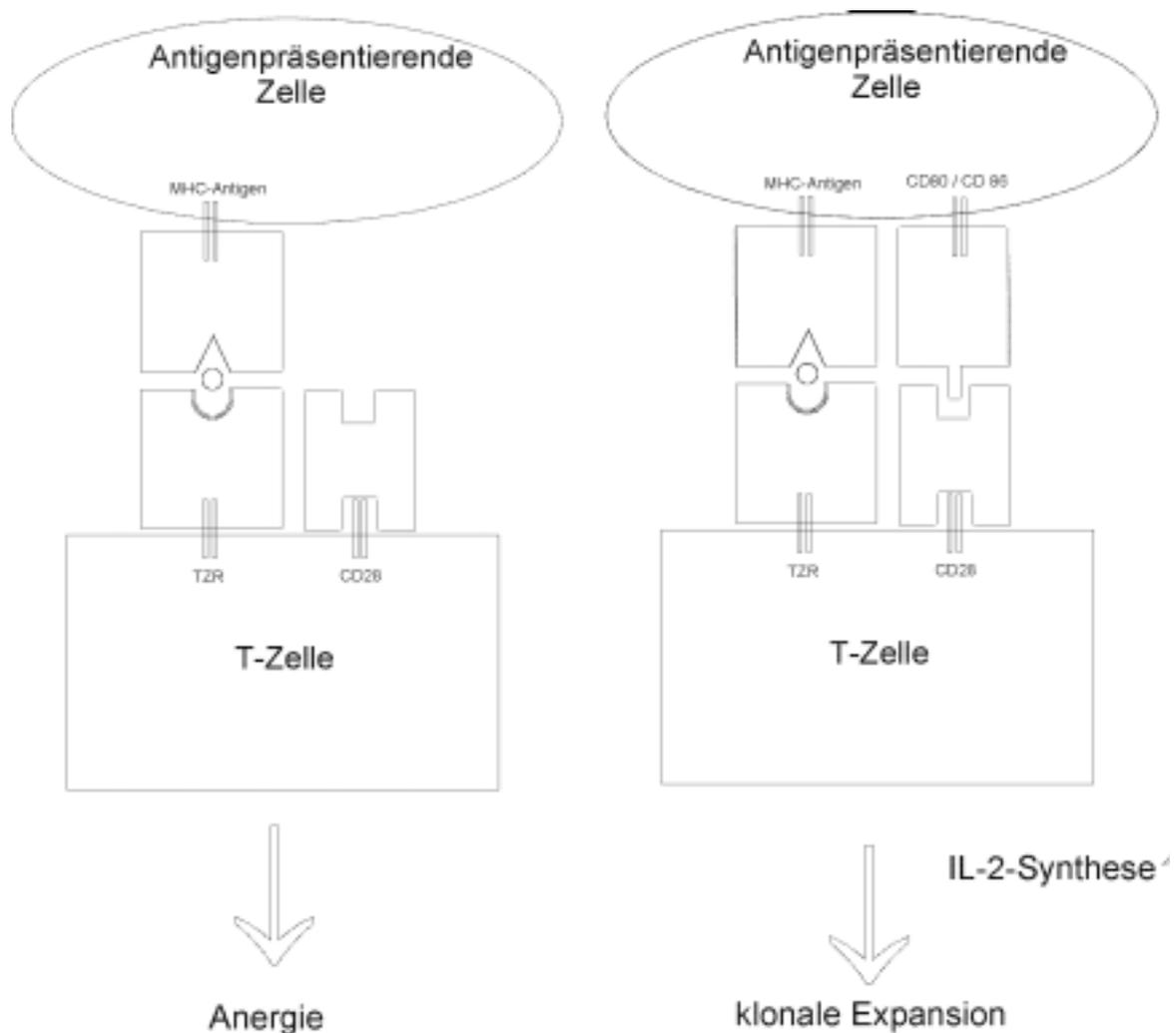


Diagramm 1: Antigenpräsentation an einer T-Zelle mit und ohne Co-Stimulation:

In Abwesenheit eines co-stimulatorischen Signals über den CD28-CD80/86-Weg kommt es zur Anergie der T-Zelle. Nur bei erfolgreicher Co-Stimulation kommt es zur Ausschüttung von IL-2 und dadurch verstärkt zur klonalen Proliferation.

Die Wechselwirkungen zwischen CD28, CTLA-4, CD80 und CD86 untereinander üben einen wichtigen Einfluß auf die T-Zell-Aktivierung und die Immunantwort aus und könnten in Zukunft auch von therapeutischer Bedeutung werden. So zeigte sich im Tierversuch, dass zuvor nicht immunogen wirksame Tumore nach Transfektion mit B7 durch CD8⁺ - T-Zellen erkannt und eliminiert werden können. Zwar wurden Tumor-Antigen-Peptid-MHC-Komplexe schon zuvor nachgewiesen, doch erst durch die Ermöglichung einer co-stimulatorischen Aktivierung konnte eine effiziente Immunantwort einsetzen [Chen et al., 1992; Townsend et al., 1993]. Durch Manipulation der CD28-B7-Interaktion gelang es *in vivo* Transplantatabstoßungen von Pankreasinseln [Lenschow et al., 1992] und allogenen Herzen [Turka et al., 1992] zu verhindern oder zumindest zu verzögern.

Die Immunantwort lässt sich in verschiedene Gruppen unterteilen. Von intrazellulären Erregern befallene Zellen präsentieren Peptide des Pathogens über MHC-I, welche von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, die die befallene Zelle zerstören. Handelt es sich hingegen um Antigene von Krankheitserregern in intrazellulären Vesikeln oder von aufgenommenen Bakterien und Toxinen, kommt es durch die Präsentation über MHC-II zu einer Aktivierung der $CD4^+$ Zellen, welche in verschiedene Untergruppen fallen, von denen die Th1- und Th2-Antwort die Extremformen darstellen. Inflammatorische T-Zellen (Th1) dienen vor allem der Abwehr von intrazellulären Erregern, z. B. durch Aktivierung von infizierten Makrophagen, die diese intrazellulären Pathogene dann eliminieren. Th2-Zellen unterstützen nach ihrer Aktivierung durch die Kommunikation mit B-Zellen die Ausschüttung von Immunglobulinen, die entweder extrazelluläre Antigene durch Bindung neutralisieren, Antigene durch Aktivierung des Komplementsystems zerstören oder durch Opsonierung diese Erreger der Eliminierung durch Phagozyten zugänglich machen.

Art der Immunantwort	zellvermittelte Immunität		humorale Immunität
typische Erreger	Vaccinavirus Influenzavirus Tollwutvirus Listerien Toxoplasma gondii	Mycobacterium leprae M.tuberculosis Leishmania donovani Pneumocystis carinii	Clostridium tetani Staphylococcus aureus Streptococcus pneumoniae Poliovirus Pneumocystis carinii
T-Zellen	$CD8^+$ -T-Zelle	inflammatorische $CD4^+$ -Zelle (Th1)	$CD4^+$ -T-Helferzelle (Th2)
Abwehr des Erregers	Zerstörung der Zelle durch $CD8^+$ -T-Zelle	Eliminierung des Erregers durch aktivierte Makrophagen	Aktivierung von B-Zellen, Ausschüttung von Immunglobulinen

Tabelle 1: Die spezifische Immunantwort (modifiziert nach Janeway)

Die Entwicklung von $CD4^+$ -T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen ist für eine suffiziente Immunantwort gegenüber unterschiedlichen Krankheitserregern sehr wichtig [Paul und Seder, 1994]. Beeinflusst wird die Differenzierung durch die Art des Mikroorganismus und das Vorhandensein bestimmter Zytokine, d. h. Botenstoffe, die von den Zellen ausgeschüttet werden und auf benachbarte Zellen wirken. Ausgereifte Th1- bzw. Th2-Zellen produzieren dann auch unterschiedliche Zytokine, die neben der Interaktion von Zelloberflächenmolekülen zwischen T-Zelle und Zielzelle eine wichtige Rolle in der Aktivierung spielen. Die unterschiedlichen Funktionen der beiden Zelltypen lassen sich durch ihr Zytokinmuster erklären [für einen Übersichtsartikel siehe Mosmann und Coffmann, 1989].

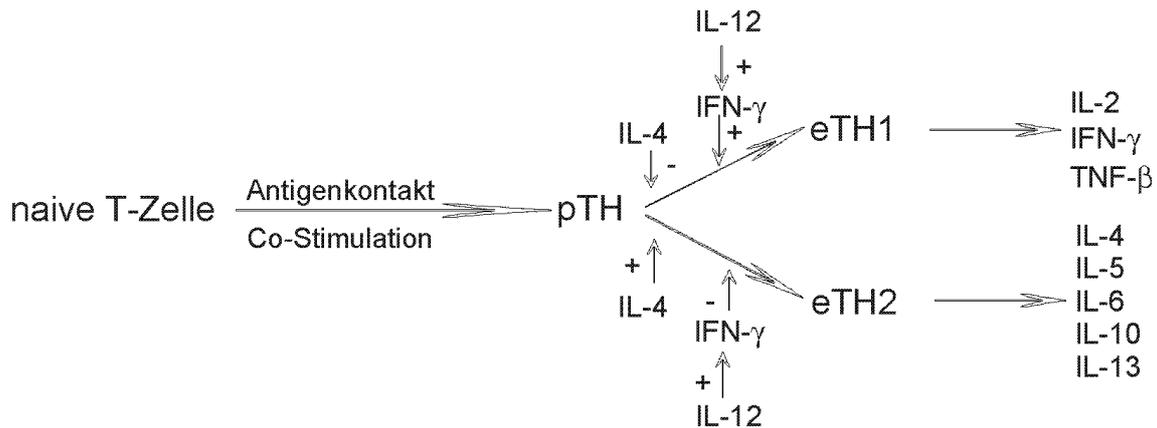


Diagramm 2: Entwicklung und Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen (modifiziert nach Paul und Seder)

Nach Antigenkontakt und bei erfolgreicher Co-Stimulation entwickelt sich eine naive CD4⁺ T-Zelle in eine precursor-T-Zelle (pTH). Unter wechselseitig regulierendem Einfluß von IL-4 bzw. IL-12 und IFN-γ differenziert sich die Zelle entweder in eine Effektor-Th2-Zelle (eTh2) oder in eine inflammatorische Effektor-Th1-Zelle (eTh1), die wiederum typische Zytokine produzieren und somit auf andere Zellen einwirken.

Die Entwicklung einer CD4⁺-T-Zelle zu einer Th1- bzw. Th2-Zelle wird durch die Anwesenheit von Zytokinen während des ersten Antigenkontakts geprägt. Bei Stimulation der naiven CD4⁺ - T-Zelle über TZR und vorhandene Co-Stimulation kommt es zu einer IL-2 Produktion und zum Übergang zu sogenannten Precursor-TH-Zellen (pTH). Über ein Th₀ Stadium [Kamogawa et al., 1993], in dem die Zelle IFN-γ und IL-4 produziert [Street et al., 1990], entwickeln sich die Zellen unter dem Einfluß von IL-2, IFN-γ und IL-12 zu Effektor-Th1-Zellen (eTh1) bzw. bei Vorhandensein von IL-2 und IL-4 zu eTh2-Zellen. IL-12 hat einen indirekten Einfluß auf die Th1-Zellen, da es die IFN-γ-Bildung stark erhöht. Die antagonistischen Zytokine haben jeweils einen hemmenden Effekt auf die Entwicklung der anderen TH-Zellen-Art. So blockiert IL-4 die Bildung von IFN-γ-produzierenden Zellen komplett, wenn kein IL-12 vorhanden ist und signifikant, aber unvollständig, wenn IL-12 vorhanden ist [Seder et al., 1992]. Im Gegensatz dazu führt IFN-γ zu einer teilweisen Unterdrückung der Entstehung von IL-4-produzierenden Zellen, ein Effekt, der durch IL-12 noch verstärkt wird [Seder et al., 1993]. IL-12 wird von Makrophagen produziert, die mit intrazellulären Mikroorganismen infiziert sind. Bei Kontakt dieser Makrophagen mit einer CD4⁺-T-Zelle führt die Ausschüttung von IL-12 zu einer IFN-γ-Produktion dieser T-Zelle. Die Balance zwischen lokalem IL-4 und IL-10 auf der Th2-Seite und IFN-γ und IL-12 auf der Th1-Seite ist ein Schlüsselfaktor in der Ausbildung von Effektor-T-Zellen [Nakumara et al., 1997]. Das Wechselspiel zwischen Th1 und Th2 ist für eine suffiziente und vor allem nicht überschießende Immunantwort wichtig. Da die Zytokine der Gruppen antagonistisch wirken, können Schäden durch eine zu starke Immunantwort unterdrückt werden. Bei einer Infektion mit einem intrazellulären Erreger kann es bei einer weiteren Ausbreitung des Erregers oder einer zu langsamen Eliminierung zu einer kontinuierlichen Aktivierung von Th1-Zellen kommen. Daraus kann ein lokal inflammatorischer Gewebsschaden entstehen, welcher die normale Funktion

einschränken kann. Durch IL-4 und IL-10 können Th2-Zellen die IFN- γ -Wirkung auf Makrophagen verkleinern bzw. die Produktion von IFN- γ unterdrücken und somit „selbstinduzierte Verletzungen“ kontrollieren.

Unklar ist bisher die Herkunft des IL-4 für die initiale Differenzierung der Th2-Zellen. Schon vorhandene Th2-Zellen - Gedächtniszellen [Gollob et al., 1994] und bereits aktivierte T-Zellen - [Croft et al., 1995] kommen in Frage. Auch Mastzellen [Bradding et al., 1992] und Basophile [Romagnani, 1992] produzieren zwar IL-4, jedoch reagieren Antigene im Körper nicht sofort mit diesen Zellen sondern erst bei einer sekundären Immunantwort. Ein weitere Möglichkeit sind $\gamma\delta$ -T-Zellen [Ferrick et al., 1995] und CD4⁺ NK1.1.-Zellen [Arase et al., 1993; Yoshimoto et al., 1994], die IL-4 bei Stimulation mit Pathogenen produzieren können. Interessanterweise ist die IL-4-Bildung von CD4⁺ NK1.1.-Zellen nicht durch antagonistische anti-IL-4-Antikörper zu inhibieren [Yoshimoto et al., 1994].

Th1-Zellen und Th2-Zellen wirken auf B-Zellen, stimulieren diese zur Differenzierung in Plasmazellen und zur Ausschüttung von Immunglobulinen, wobei Th1- und Th2-Zellen unterschiedlicher Immunglobulinmuster induzieren. Während Th1-Zellen der Maus vor allem die Produktion von IgG2a anregen, wird durch die Zytokine der Th2-Zellen vor allem die Produktion von IgG1 und IgE verstärkt [Mosmann und Coffmann, 1989]. Um Verwirrung bei dem Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen zu vermeiden, soll hier kurz auf die Zusammenhänge zwischen den Immunglobulinsubtypen von Maus und Ratte eingegangen werden. IgG1 der Ratte entspricht sowohl in der Sequenz [Brüggemann et al., 1986 und 1988] als auch bei Antigen-Kreuz-Reaktionen [Carter et al, 1980] dem IgG1 der Maus. Auch IgE der beiden Arten ist äquivalent. Beide Immunglobulintypen zeigen in der Ratte ein Th2-Immunantwort an [Soares et al., 1996; Mason, persönliche Mitteilung]. Etwas komplizierter ist die Rolle von IgG2a, welches bei der Maus einer Th1-Immunantwort entspricht. Die Gensequenz des Ratten-IgG2a entspricht dem Maus-IgG1. Das Ratten-IgG2b entspricht dem Maus-IgG2a [Brüggemann et al., 1986 und 1988]. Diese Zusammenhänge konnten auch in mehreren funktionellen Untersuchungen bestätigt werden [Der Balian et al., 1980; Cuturi et al., 1994; Sakai et al., 1995]. Das bedeutet, dass bei der Ratte IgG1, IgG2a und IgE eine Th2-gewichtete Immunantwort anzeigen. Die verstärkte Bildung von IgG2b spricht für eine Th1-Antwort [Mason, persönliche Mitteilung]. In Diagramm 3 sind die Zusammenhänge zwischen Maus- und Rattenimmunglobuline sowie die Art der Immunantwort aufgezeigt [Mathieson; 1992; Groen, 1993; Beijlvelde et al., 1996].

Maus-Ig-Subklasse	IgG1	IgE	IgG2a
--------------------------	------	-----	-------

(entsprechende) Ratten-Ig-Subklasse	IgG1	IgG2a	IgE	IgG2b
Immunantwort	Th2			Th1

Diagramm 3: Vergleich der Immunglobulinsubklassen von Maus und Ratte

Einer der Faktoren, die in die Th1/Th2-Differenzierung eingreifen, ist die Co-Stimulation über CD28, wobei die hierzu durchgeführten Versuche sehr interessante Möglichkeiten in der Entstehung und vielleicht in Zukunft auch in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Infektionen zeigen. Shahinian konnte an CD28^{-/-} - Mäusen zeigen, dass bei den Tieren die Entwicklung und negative Selektion der T-Zellen völlig normal abläuft. Phänotypisch sind die T- und B-Zellen CD28-defizienter Mäuse normal. Allerdings war bei Stimulation der Zellen mit ConA eine deutlich verminderte IL-2-Produktion und eine deutlich verminderte Expression des IL-2-Rezeptors festzustellen [Shahinian et al., 1993]. In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass antigen-spezifische T-Zell-Antworten, z. B. nach KLH-Stimulation reduziert waren. Bei Infektion mit dem mouse mammary tumor virus (MMTV) [Palmer et al., 1996] zeigen die Tiere eine verminderte IL-2-Produktion, eine verminderte B-Zell-Aktivität und eine Veränderung der Immunglobulinkonzentration im Serum. Nachweisbar ist eine Verminderung von IgG1 bei gleichzeitigem Anstieg von IgG2a. Da T-Zell-Antworten teilweise noch vorhanden waren, ist es wahrscheinlich, dass andere Wege der Co-Stimulation bzw. andere co-stimulatorische Rezeptoren in Aktion treten bzw. neben IL-2 auch noch andere Lymphokine eine wichtige Rolle spielen. Insgesamt zeigt sich, dass CD28-defiziente Mäuse eine normale Th1-Immunantwort zeigen, bei einer gleichzeitig verringerten Th2-Antwort. CD28^{-/-} Mäuse zeigen bei einer Infektion mit Schistosomen eine deutlich geringere Produktion von IL-4 und IL-5, IgG1 und IgE, sind anfälliger für eine Infektion und zeigen stärkere Krankheitszeichen als CD28^{+/+} Vergleichstiere. Unterbrechung der CD28-CD80/CD86-Interaktion durch Gabe von CTLA-4-Ig unterdrückte auch bei CD28^{+/+} Mäusen die Th2-Antwort [King et al., 1996]. Die Inzidenz und Schwere der durch autoreaktive Th1-Zellen induzierten [Kuchroo et al., 1993] experimentellen Allergischen Enzephalitis (EAE) konnte durch Gabe von anti-CD80-Antikörpern und auf diese Weise verstärkte Th2-Antwort reduziert werden, wobei das Immunsystem der Tiere durch diese Behandlung keine generelle Beeinträchtigung zeigte [Kuchroo et al., 1995]. In Untersuchungen mit CD28 positiven bzw. defizienten Mäusen konnten Rulifson et al. zeigen, dass die Co-Stimulation über CD28 durch einen IL-4 abhängigen Mechanismus die Th2-Cytokinproduktion bewirkt. Zusätzlich konnte durch Versuchen mit RAG 2^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht durch eine Restimulation von Memory-Zellen in vitro hervorgerufen wird [Rulifson et al., 1997].

Durch die Genierung zweier CD28-spezifischer mAk gegen das CD28-Molekül in der Ratte, JJ316 [Tacke, 1997] und JJ319 [Tacke, 1995], konnte das System der Co-Stimulation auch in ein Modellsystem übertragen werden, welches für Autoimmunerkrankungen und die

Transplantationsmedizin von großer Bedeutung ist. Bei Experimenten *in vitro* zeigten diese Antikörper - ähnlich wie bei Maus und Mensch - in Anwesenheit eines TZR-Signals eine Aktivierung der Zellen. Tacke et al. konnten zeigen, dass es neben diesem co-stimulatorischen Aktivierungsweg möglich ist, mit einem der beiden Antikörper - mAk JJ316 - die Zellen ohne TZR-Signal/TZR-Ligation zu stimulieren [Tacke et al., 1997]. In 100-1000fach höherer Konzentration des mitogenen mAk JJ316 kommt es zu einer massiven Proliferation aller T-Zellen *in vitro* durch direkte Stimulation ohne zusätzliches Signal über den TZR (siehe Diagramm 4), eine Wirkung, die mit dem konventionellen mit JJ319 nicht zu erreichen ist. Auch im humanen System ist eine Aktivierung von T-Zellen durch Vermittlung über CD28 unter Umgehung des TZR-Signals beschrieben worden [Siefken et al., 1997].

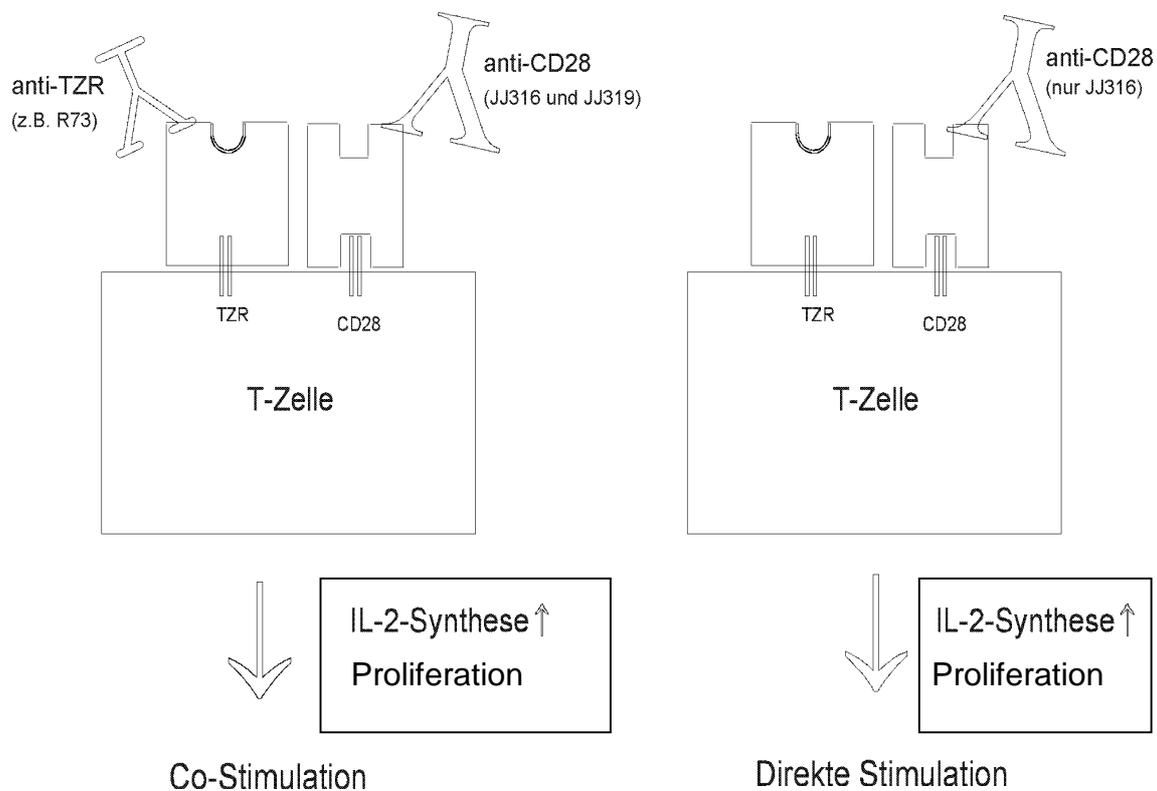


Diagramm 4: Co-Stimulation und direkte Stimulation einer T-Zelle

Anders als bei der bisher bekannten Co-Stimulation durch Antigenpräsentation über MHC bei gleichzeitiger Bindung eines co-stimulatorischen Liganden (z. B. CD80/86 an CD28) kann der mAk JJ316 in der Ratte auch ohne zusätzliche Antigenpräsentation eine Proliferation der T-Zellen induzieren.

Bemerkenswert ist, daß auch *in vivo* die Wirkung des mitogenen mAk JJ316 nachzuweisen war. Durch eine Einzeldosis von JJ316 i.p. kam es zu einer starken, temporären Vergrößerung der Milz und der Lymphknoten mit maximalen Werten nach drei Tagen [Tacke et al., 1997]. Vor allem CD4⁺-T-Zellen erhöhten sich beträchtlich (auf etwa das Sechsfache in der Milz und auf etwa das Dreifache in den Lymphknoten), aber auch CD8⁺-T-Zellen stiegen an, wobei nach etwa

zwei Wochen die Zellzahlen wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken waren. Bedingt durch die Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen erhöhte sich auch die Anzahl der B-Zellen (auf etwa das Vierfache in der Milz). Dass der B-Zell-Anstieg T-Zell-abhängig ist, zeigten Kontrollversuchen in euthymischen und athymischen Ratten, da in letzteren keine B-Zell-Aktivierung nachweisbar war. Die Aktivierung durch CD28 ohne TZR-Signal könnte sich erklären, wenn es durch die Bindung von mAk JJ316 an CD28-Moleküle zu einer Konfigurationsänderung käme, über die das aktivierende Signal an die T-Zelle geleitet wird. Wahrscheinlicher ist die Mobilisierung des CD28-Rezeptors, d. h. die Verdrängung inhibitorischer Moleküle von CD28, so dass CD28 in der Lage ist, einen eigenständigen Signalweg zu induzieren. In der physiologischen Situation wird diese Mobilisierung durch den TZR induziert, so dass geringe anti-CD28-Konzentrationen für eine Aktivierung ausreichen. Bei der direkten Stimulation, d. h. der alleinigen Gabe von mAk JJ316, ist eine höhere Konzentration des Antikörpers notwendig, da in diesem Fall der Antikörper selber die inhibitorischen Moleküle verdrängen muss.

Die Stimulation über CD28 kann die Immunantwort von mit *Schistosoma mansoni* infizierten [King et al., 1996] bzw. an Experimenteller Allergischer Enzephalitis erkrankten [Kuchroo et al., 1995] Tieren in Richtung Th2 verändern. In der humanen Jurkat T-Lymphom-Linie wird IL-2-Synthese durch bestimmte CD28-spezifische mAk induziert [Nunes et al., 1993] und ein Signalweg, durch den IL-4-Transkription nach CD28-Stimulation induziert wird, konnte kürzlich nachgewiesen werden [Li-Weber et al., 1998]. Etwa 5% der CD4⁺CD45R0⁻ - T-Zellen differenzieren bei Stimulation mit CD28-spezifischen Antikörpern und gleichzeitiger Gabe von IL-2 zu Th2-spezifischen Zellen, ohne das ein zusätzliches Signal über den TZR notwendig ist [Brinkmann et al., 1996].

Aufgrund der Tatsache, dass die CD28-Co-Stimulation eine wichtige Rolle in der Th2-Differenzierung einnimmt, ist der Effekt einer direkten Stimulation mit dem mitogenen mAk JJ316 auf diese Differenzierung von besonderem Interesse. G. Hanke konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit JJ316 *in vivo* zu einem erhöhten IgG1-Serumlevel führt [Hanke, 1997].

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss des mitogenen anti-CD28-mAk JJ316 auf die Entwicklung einer Th1- bzw. Th2-Immunantwort anhand der Immunglobulin-Isotypen behandelte Tiere zu untersuchen. Es wird gezeigt, dass die Behandlung mit mitogenem mAk JJ316 bei Brown-Norway- und Lewis-Ratten verschiedener Altersstufen eine Th2-Immunantwort induziert, erkennbar an einem Anstieg der Th2-spezifischen Immunglobuline, besonders des IgE.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Monoklonale Antikörper zur in-vivo-Behandlung

Folgende mAk gegen Oberflächenantigene auf Lymphozyten der untersuchten Ratten wurden unkonjugiert verwendet:

mAk	Spezifität	Referenz
JJ316	CD28	Tacke et al., 1997
JJ319	CD28	Tacke et al., 1995
R73	TCR $\alpha\beta$	Hünig et al., 1989

2.1.2. Antikörper zur ex-vivo-Analyse

Primäre Antikörper für ELISA und ELISPOT:

Schaf anti Ratte IgG1	The Binding Site, Birmingham, Großbritannien
Schaf anti Ratte IgG2a	The Binding Site, Birmingham, Großbritannien
Schaf anti Ratte IgG2b	The Binding Site, Birmingham, Großbritannien
Schaf anti Ratte Ig (G+A+M)	The Binding Site, Birmingham, Großbritannien
Maus anti-Ratte κ (MARK-1)	freundlicherweise von Dr. H. Bazin, Louvain, Belgien, zur Verfügung gestellt

Sekundäre Antikörper für ELISA und ELISPOT:

Maus anti Ratte IgG1, Biotin konjugiert (M α RlgG1-bio)	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Maus anti Ratte IgG2a, Biotin konjugiert (M α RlgG2a-bio)	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Maus anti Ratte IgG2b, Biotin konjugiert (M α RlgG2b-bio)	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Maus anti Ratte IgM, Biotin konjugiert (M α RlgM-bio)	Serotec, Oxford, Großbritannien
Maus anti Ratte IgE, Biotin konjugiert (M α RlgE-bio)	Serotec, Oxford, Großbritannien
Maus anti Ratte κ ,	

Biotin konjugiert (MARK-1-bio)

laboreigene Herstellung

Immunglobulinstandards für ELISA:

Ratte IgG1

Pharmingen, San Diego, CA, USA

Ratte IgG2a

Pharmingen, San Diego, CA, USA

Ratte IgG2b

Pharmingen, San Diego, CA, USA

Ratte IgM

Pharmingen, San Diego, CA, USA

Ratte IgE

Serotec, Oxford, Großbritannien

Antikörper für die FACS-Analysen:

L180/1 Schaf-LFA-3

Hünig, 1985

OX33 LCA von B-Zellen

Woollet, 1985

F(ab)₂-Fragmente Esel anti Maus Ig,

PE konjugiert (D α Mlg-PE)

Dianova, Hamburg

Streptavidin Red 670TM

Gibco BRL, Eggenstein

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Alaun

Roth, Karlsruhe

Albumin (Hühnerei), OvA

Sigma, Deisenhofen

AMP

Sigma, Deisenhofen

Agarose („low melting point“)

Roth, Karlsruhe

Borsäure

Roth, Karlsruhe

Bordetella-Pertussis-Toxin

freundlicherweise von Prof. A. Schimpl,
Institut für Virologie und Immunbiologie,
Würzburg, zur Verfügung gestellt

BSA (Rinderserumalbumin)

Sigma, Deisenhofen

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
(BCIP)

Sigma, Deisenhofen

Diethanolamin

Sigma, Deisenhofen

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Roth, Karlsruhe

Ethanol

Ferak, Berlin

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Ferak, Berlin

Fötale Kälberserum (FCS)

Gibco BRL, Eggenstein

Formaldehyd (37%)

Ferak, Berlin

Glycin

Roth, Karlsruhe

³H-Thymidin (spezifische Aktivität 5Ci/mmol)

Amersham Buchler, Braunschweig

KCl

Ferak, Berlin

Methoxyfluran (Metofane)	Janssen, Neuss
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Ferak, Berlin
Natriumazid (NaN ₃)	Ferak, Berlin
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
(Na) ₂ CO ₃	Ferak, Berlin
NaHCO ₃	Ferak, Berlin
NaOH	Ferak, Berlin
p-Nitrophenyl-Phosphat (p-NPP)	Sigma, Deisenhofen
Protein-A-Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Streptavidin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Streptavidin-AP)	Boehringer Mannheim
Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate (Sulfo-NHS-Biotin)	Pierce, Rockford, Großbritannien
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 (Polyoxyethylen sorbitan mono)	Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure (10%)	

2.1.4. Standardlösungen, Puffer und Medien

AMP-Lösung	95,8ml AMP, 150mg MgCl ₂ x6H ₂ O, 100µl Triton, ad 1000ml H ₂ O dest., mit HCl auf pH=10,25 einstellen
BCIP/AMP	100mg BCIP in 100ml AMP-Lösung
Beschichtungspuffer	0,8g Na ₂ CO ₃ , 1,45g NaHCO ₃ , ad 500ml H ₂ O dest.
Boratpuffer	0,1 M Borsäure mit pH=8
BSS (Balanced Salt Solution I, II)	BSS I: BSS II: 50g Glukose 9,25g CaCl ₂ 3g KH ₂ PO ₄ 20g KCl 11,9g Na ₂ HPO ₄ 320g NaCl

	0,5g Phenolrot 10g MgCl ₂ 10g MgSO ₄ ad 5l H ₂ O bidest ad 5l H ₂ O bidest 125ml BSS I mit 125ml BSS II mischen und mit H ₂ O ad 1000ml auffüllen
BSS/BSA	0,2% BSA in BSS
Diethanolaminpuffer einstellen	48,5ml Diethanolamin, 0,1g NaN ₃ , 50mg MgCl ₂ , ad 500ml H ₂ O dest., mit HCl auf pH=9,8
Elutionspuffer	7,35g Na ₃ -Citrat, 2,92g NaCl, ad 500ml Aqua dest., mit 10%iger Zitronensäure auf pH=3 ein- stellen
FACS-Puffer	0,1% BSA, 0,02% NaN ₃ in PBS
Hochsalzpuffer	112,6g Glycin, 175,3g NaCl, ad 1000ml Aqua dest., mit 5M NaOH auf pH=8 einstellen
PBS (Phosphate Buffered Saline)	0,2g KCl, 0,2g KH ₂ PO ₄ , 0,05g MgCl ₂ , 8gNaCl, 1,15g Na ₂ HPO ₄ ad 1000ml H ₂ O bidest
PBS/Azid	0,02% NaN ₃ in PBS
PBS/BSA	1% BSA in PBS
PBS/FCS	5% FCS in PBS
PBS/Tween 20	0,05% Tween 20 in PBS
PBS/Tween20/BSA PBS -Cl ²⁺ , -Mg ²⁺	0,05% Tween 20, 1% BSA in PBS laboreigene Herstellung
RPMI 1640 RPMI ⁺	Gibco BRL, Eggenstein RPMI, 5% FCS
Stoppuffer	20mM Tris in PBS mit pH=8

Tris-Ammonium-Chlorid-Puffer	0,48g Tris, 1,66g NH ₄ Cl, ad 200ml Aqua dest.
Trypanblau	0,04% in PBS/Azid

2.1.5. Standards und Kits

Biorad™-Proteinassay	Biorad München
----------------------	----------------

2.1.6. Geräte

Durchflußzytometer FACScan®	Becton Dickinson, Heidelberg
LYSIS II® Software	
CellQuest Software	
Szintilationszähler Betaplate II	Wallac Oy, Turku, Finnland
Zellerntegerät für 96-Napfplatten	Wallac Oy, Turku, Finnland
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Servall-SS34-Festwinkelrotor	Heraues, Hanau
Tisch-Ultra-Zentrifuge	Heraus, Hanau
UV-Photometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Zentrifuge	Heraues, Hanau

2.1.7. Gebrauchsmaterialien

15ml Röhrchen	Greiner, Nürnberg
50ml Röhrchen	Greiner, Nürnberg
25-Napf-Flachbodenplatten	Greiner, Nürnberg
96-Napf-Flachbodenplatten	Greiner, Nürnberg
96-Napf-U-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
Centricon-Ultrafiltrationseinheit	Heraues, Hanau
Einmalsiebe	Greiner, Nürnberg
Eppendorf-Pipetten	Greiner, Nürnberg
Eppendorf-Röhrchen	Greiner, Nürnberg
FACS-Probenröhrchen	Multimed, Kirchheim, Frankreich
Glasfaserfiltermatten	Pharmacia, Freiburg
Glaskapillare	Greiner, Nürnberg

Kanülen 21G	Greiner, Nürnberg
Spritzen 1ml, 5ml, 20ml, 50ml	Greiner, Nürnberg
Sterilfilter	Greiner, Nürnberg
Szintillationsflüssigkeit	Pharmacia, Freiburg
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Nürnberg

Bei allen nicht aufgeführten Geräten und Materialien handelte es sich um Standardgeräte und handelsübliche Gebrauchsmaterialien.

2.2. Versuchstiere

Die Versuche wurden mit Inzuchtstämmen von Lewis- und Brown-Norway-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden von folgenden Quellen bezogen:

Rasse	Alter	Herkunft
Lewis-Ratten	Jungtiere (1 Woche)	Charles River Wiga (Sulzfeld)
	Erwachsene Tiere (9 Wochen bis 3 Monate)	Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
	Alttiere (7 Monate)	Charles River Wiga (Sulzfeld)
Brown-Norway-Ratten	Jungtiere (1 Woche)	Harlan-Winkelmann UK
	Erwachsene Tiere (3 Monate)	
	Alttiere (7 Monate)	

2.3. Methoden

2.3.1. In vivo Applikation der monoklonalen Antikörper JJ316, JJ319 und R73

Eine Woche bis neun Monate alten Lewis (LEW)- und Brown-Norway (BN)-Ratten wurde eine Einzeldosis oder mehrere Dosen mAk JJ316, JJ319, R73 oder PBS in gleichem Volumen in den angegebenen Dosierungen intraperitoneal (i.p.) appliziert. Nach verschiedenen Zeiträumen wurden die Tiere getötet. Aus der entnommenen Milz wurden die Lymphozyten isoliert. Den Ratten wurde Blut abgenommen und daraus Serum gewonnen. Mit den Lymphozyten und dem Serum wurden weitere Analysen durchgeführt.

2.3.2. In vivo Immunisierung mit OVA-Pertussis

Die Wirkung der mAk JJ316, JJ319 und R73 wurde auch an Tieren untersucht, die zuvor mit einer Suspension aus OvA und Bordetella Pertussis Toxin behandelt wurden.

10 ml BSS wurden mit 100 ng OvA und 5 ml 10%igem Alaun vermischt. Zugabe von 2ml 1 M NaOH führt zur Ausbildung von Proteinpräzipitaten, welche durch 30minütige Lagerung auf Eis und anschließende Zentrifugation mit 2000 Umdrehungen/Minute (Upm) bei 6 °C getrennt werden können. Zweimaliges Waschen mit PBS, Resuspension der Proteinpräzipitate in 20 ml PBS und Zupipettieren von 40 µl einer Lösung mit 2×10^{12} Bordetella Pertussis. 2 ml dieser Lösung wurde den Tieren i.p. appliziert und die Tiere nach vier Wochen mit den monoklonalen Antikörpern bzw. PBS weiterbehandelt.

2.3.3. Herstellung der Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen

Am Versuchstag wurden die Ratten mit CO₂ getötet, auf dem Rücken gelagert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Sterile Entnahme von Milz, sowie mesenterialen und inguinalen Lymphknoten, weitgehende Säuberung von Fett- und Gewebsresten und Lagerung in eisgekühlten BSS/BSA. Die weiteren Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Milz und Lymphknoten wurden in sterilen Sieben zerrieben, die Zellen durch wiederholtes Spülen mit BSS/BSA in ein 15 ml-Röhrchen (Lymphknoten) bzw. ein 50 ml-Röhrchen (Milz) überführt. Abtrennung größerer Gewebeteile durch Lagerung für zehn Minuten auf Eis, Übernahme des Überstands in ein neues 15 ml-/50 ml Röhrchen, Zentrifugation bei 1600 Upm für fünf Minuten bei 6 °C führte zu Absinken der Zellen. Absaugen des Überstandes. Zugabe von 10 ml Tris-Ammonium-Chlorid-Puffer (TAC-Puffer) für zehn Minuten zu den Milzzellen lysierte die in der Milzzellsuspension vorhandenen Erythrozyten, so dass anschließend die zu untersuchenden Lymphozyten isoliert waren. Erneutes Zentrifugieren bei 1600 Upm für fünf Minuten bei 6 °C, Absaugen des TAC-Überstandes, zweimaliges Waschen mit 40 ml BSS/BSA und Überführung in RPMI⁺ überführt. Bei Lymphknotenzellen keine Zugabe von TAC-Puffer,

einmaliges Waschen mit 10 ml BSS/BSA und Resuspension in RPMI⁺. Anschließend wurde die Zellzahl in den Suspensionen in unten beschriebener Weise ermittelt.

2.3.4. Ermittlung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Milz- bzw. Lymphknotenzellsuspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellsuspension wurde mit 0,04%iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:20 verdünnt. Trypanblau wird nur von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht auf diese Weise die Unterscheidung der Zellen unter dem Binokular. Unter dem Mikroskop wurden die lebenden, d. h. die nicht Trypanblau speichernden, Zellen ausgezählt und die Gesamtkonzentration der Zellsuspension anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / Anzahl der Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

2.3.5. Serumgewinnung

Die Gewinnung des Serums erfolgte entweder durch kardiale Punktion oder durch Punktion der retroorbitalen Venengeflechte.

Den getöteten Ratten wurde bei eröffnetem Brustkorb mit einer 21G Kanüle durch Punktion des rechten Vorhofs etwa 5 ml Blut entnommen. Gewinnung des Serums durch Abzentrifugieren bei 2000 Upm für fünf Minuten bei 6 °C und anschließend erneutem Zentrifugieren des Überstands in der Ultra-Zentrifuge bei 10000 Upm für eine Minute. Sollte das Serum nicht am gleichen Tag untersucht werden, wurde es bei -18 °C eingefroren.

Für die Messung des individuellen Immunglobulinverlaufs bei LEW-Ratten über drei Wochen wurde den Tieren in Methoxyfluran-Narkose Blut mit einer Glaskapillare aus dem retroorbitalen Venengeflecht entnommen. Durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 10000 Upm für eine Minute konnte das Serum gewonnen werden.

2.3.6. ELISPOT Assay

Der enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay gibt die Möglichkeit, die Frequenz immunoglobulinproduzierender Zellen spezifisch für bestimmte Isotypen darzustellen.

25-Napf-Flachbodenplatten wurden mit den primären Antikörpern beschichtet. Zum Nachweis der verschiedenen Immunglobulinsubtypen wurden unterschiedliche Antikörper verwendet. Für IgG1, IgG2a und IgG2b jeweils ein subklassenspezifischer Schaf-anti-Ratte-Antikörper, Schaf-anti-Ratte-Ig (G+M+A) für IgM bzw. Maus-anti-Ratte-kappa-1 (MARK-1) für IgE. Je 1 ml wurde mit einer Konzentration von 5 µg/ml (algG1, algG2a, algG2b, algG+M+A) bzw. 1:100 (MARK-1) in Beschichtungspuffer pro Napf pipettiert und die Platten bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Nach Abnahme der primären Antikörper und viermaligem Waschen der Platten mit PBS, wurden, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, die Platten für zwei Stunden mit je 1 ml PBS/FCS bei Raumtemperatur geblockt. Die Zellsuspension wurde in oben beschriebener Weise hergestellt und je 1 ml in gewünschter Konzentration (10^6 oder 10^7 Zellen/ml in RPMI⁺ für die Immunglobulinsubtypen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgE, 10^5 oder 10^6 Zellen/ml in RPMI⁺ für IgM) in die Näpfe eingefüllt und die Platten über Nacht bei 37 °C und 5%CO₂ inkubiert.

Viermaliges Waschen der Platten mit PBS. Zur Detektion sezernierter Immunglobuline Inkubation der Platten mit je 1 ml biotinylierten sekundären Antikörper Maus-anti-Ratte (anti-IgG1-bio, anti-IgG2a-bio, anti-IgG2b-bio, anti-IgM-bio, anti-IgE-bio) in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS/FCS für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Viermaliges Waschen der Platten mit PBS. Inkubation der Platten mit je 1 ml mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin der Verdünnung 1:1000 in PBS/FCS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Viermaliges Waschen der Platten mit PBS. Für die Nachweisreaktion wurde die AMP/BCIP-Lösung auf 37 °C erwärmt, 3%ige „low melting point“ Agaroselösung aufgekocht, auf 42 °C abgekühlt, die beiden Lösungen in einem Verhältnis von 6:1 gemischt und 1 ml dieses Gemisches pro Napf pipettiert. Die alkalische Phosphatase katalysierte die Bildung eines blauen Farbkomplexes aus dem farblosen Substrat BCIP, so dass an den Stellen, an denen sich immunglobulinproduzierende Zellen befanden, nach etwa fünf bis zehn Minuten blaue Punkte (Spots) auftraten. Nach etwa 30 Minuten verfestigte sich die Agarose und die Spots konnten im Binokular gezählt werden.

2.3.7. ELISA

Mit dem enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) ist es möglich, die Konzentration der Immunglobuline im Serum behandelter Ratten nachzuweisen.

Analog zum ELISPOT wurden zum Nachweis der verschiedenen Immunglobulinsubtypen unterschiedliche Antikörper verwendet. Für IgG1, IgG2a und IgG2b der subklassenspezifische Schaf-anti-Ratte-Antikörper, Schaf-anti-Ratte-Ig (G+M+A) für IgM bzw. Maus-anti-Ratte-kappa-1 (MARK-1) für IgE. 96 - Napf - Flachbodenplatten wurden mit 100 µl primären Antikörpern einer Konzentration von 1 µg/ml bzw. 1:1000 für MARK-1 in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Abnahme der primären Antikörper und viermaliges Waschen mit PBS/Tween 20. Bei Raumtemperatur Blockung mit je 100 µl PBS/BSA für eine Stunde, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu eliminieren. Viermaliges Waschen mit PBS/Tween 20. Zur Feststellung der Antikörperkonzentration wurde auf jeder Platte für die nachzuweisenden Isotypen ein Immunglobulin-Standard untersucht, mit dem eine Standardkurve erstellt wurde. 100 µl in absteigenden Konzentrationen von 405 ng/ml bis 5 ng/ml in PBS/Tween 20/BSA IgG1, IgG2a und IgG2b bzw. 135 ng/ml bis 1 ng/ml in PBS/Tween 20/BSA IgE wurden pro Napf einpipettiert. Für IgM war kein Standard vorhanden, hier wurden die jeweiligen Werte in Relation zueinander untersucht. Das Serum der Tiere wurde wie oben beschrieben gewonnen und entweder direkt verarbeitet oder bei -18 °C eingefroren. Die Konzentration des Serums richtete sich nach den zu erwartenden Immunglobulinmengen - für IgE wurde meist eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:625 gewählt, für die anderen Isotypen meist 1:1000 bis 1:625000. Die Verdünnungen wurden in PBS/Tween 20/BSA durchgeführt und je 100 µl pro Napf pipettiert. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Dreimaliges Waschen mit PBS/Tween 20 und Inkubation mit je 100 µl biotinylierten Nachweisantikörper der Konzentration 1 µg/ml in PBS/Tween 20/BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dreimaliges Waschen mit PBS/Tween 20 und Inkubation mit je 100 µl mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS/Tween20 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Viermaliges Waschen mit PBS/Tween 20. Zum Entwickeln der Platten wurde eine Tablette p-Nitrophenyl-Phosphat in 10 ml Diethanolaminpuffer aufgelöst und je 100 µl dieser Lösung pro Napf einpipettiert. Nach 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur bildete sich eine gelbe Farbreaktion, die bei höherer Antikörperkonzentration entsprechend stärker ausfiel. Im Spektrophotometer wurde die Absorption bei 405 nm bestimmt und mit Hilfe der Standardkurve die genaue Antikörperkonzentration im Serum berechnet.

2.3.8. In vitro - Produktion von Immunglobulinen und Nachweis im ELISA

Neben der in vivo - Produktion von Immunglobulinen wurde auch die Antikörperproduktion im Überstand von Zellkulturen mit und ohne Zugabe des mAk JJ316 untersucht. Je 5×10^5 ungetrennte Lymphknotenzellen/ml einer erwachsenen Brown-Norway-Ratte wurden in 96-Napf-

U-Platten inkubiert, die Hälfte unter Zugabe von 5µg/ml mAk JJ316 in RPMI⁺. Am zweiten, vierten und siebten Tag wurde mit den Überständen ein ELISA in oben beschriebener Weise durchgeführt.

2.3.9. Proliferationstest

Mit Hilfe des Proliferations-Assays ist es möglich, durch Messung des Einbaus von ³H-markierten Thymidin die Zellproliferation in einer Kultur zu ermitteln.

Untersucht wurde die Proliferationsrate von ungetrennte Lymphknotenzellen von Lewis- und Brown-Norway-Ratten, die in oben beschriebener Weise mit löslichem OVA immunisiert wurden, denen nach vier Wochen mAk JJ316, JJ319, R73, lösliches OVA bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt wurde und deren Lymphknoten nach fünf Tagen in oben beschriebener Weise entnommen wurden. In 96-Napf-Flachbodenplatten wurden Tripletes mit 100 µl/Napf von ungetrennten Lymphknotenzellen einer Konzentration von 5x10⁵ Zellen/ml in RPMI⁺ angelegt, wobei der Hälfte der Zellen lösliches OVA in einer Konzentration von 10 µl/ml in RPMI⁺ zugegeben wurde. Die Platten wurden für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Zellen vom zweiten auf den dritten Tag für 16 Stunden mit je 25 µl (0,5µ Ci) ³H-Thymidin „gepulst“. Mit einem automatischen Zellerntegerät (Pharmacia Beta-Plate-Harvester) wurden die Zellen mit Wasser aus der 96-Napf-Flachbodenplatte gesaugt, lysiert und die radioaktiv markierte, genomische DNA auf einen Glasfaserfilter übertragen. Nicht in die DNA eingebautes ³H-Thymidin wurde ausgewaschen. Der Filter wurde für eine Stunde bei 50 °C getrocknet, anschließend in Plastikfolie eingeschweißt und 12 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Im Beta-Counter wurde nun die radioaktive Emission als Maß des ³H-Thymidineinbaus bestimmt.

2.3.10. Antikörperreinigung und -biotinylierung

MARK-1 wurde dem Institut für Virologie und Immunbiologie freundlicherweise von Dr. H. Bazin, Louvain, Belgien zur Verfügung gestellt. Zur Verwendung als primärer Antikörper in ELISPOT und ELISA wurde der in Aszitesflüssigkeit vorliegende Antikörper gereinigt und zum Einsatz als Nachweisantikörper im ELISA und ELISPOT teilweise biotinyliert.

Der Versuch wurde bei 4°C durchgeführt. 1 ml Protein-A-Sepharose wurde mit 20 ml Hochsalzpuffer in einer 10ml Säule äquilibriert. MARK-1 in der Aszitesflüssigkeit wurde mit Hochsalzpuffer in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und die Mischung zweimal durch die Säule geleitet. Während andere Proteine der Aszitesflüssigkeit nicht gebunden wurden und durch Waschen der Säule mit 15 ml Hochsalzpuffer entfernt wurden, sammelte sich der Antikörper in der Protein-A-Sepharose, wurde mit Elutionspuffer (pH=3) gelöst und jeweils in Fraktionen von 500 µl gesammelt. Zum Schutz des Antikörpers vor dem saueren pH des Elutionspuffers wurden 50 µl Tris-Puffer (pH=8) in den Röhren vorgelegt.

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde im Biorad-Protein-Assay bestimmt. Im Verhältnis 1:10 wurden Anteile jeder Fraktion mit dem Biorad-Testreagenz (1:5 in Aqua dest.) vermischt. Blaufärbung zeigt vorhandenes Protein (und somit Antikörper) an. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt.

Zur weiteren Verwendung wurde der Antikörper dialysiert. Ein 20 cm langer Membransack, der Ionenverkehr zulässt, wurde in 10mM EDTA -Lösung für 10 Minuten gekocht und anschließend beidseits mit Ampuwa gewaschen. Die Antikörperlösung wurde mit einer sterilen Plastik-Eppendorf-Pipette eingefüllt, der Membransacks verschlossen und für 72 Stunden bei 4 °C in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , welches nach je 24 Stunden gewechselt wurde, gerührt.

Die Konzentration des Antikörpers wurde mittels UV-Detektion bestimmt. Die photometrische Messung der Absorption von UV-Strahlung durch Proteine bei 280 nm beruht auf die Anwesenheit von Tyrosin und Tryptophan in den Polypeptidketten. Die Absorption für IgG einer Konzentration von 1 mg/ml beträgt bei 280 nm näherungsweise 1,35. Mit Hilfe diesen Wertes konnte die Proteinkonzentration der MARK-1-Lösung bestimmt werden.

Zur Biotinylierung wurde der gereinigte MARK-1 in eine Centricon 30 Ultrafiltrationseinheit eingefüllt und zur Entfernung von eventuell vorhandenem Tris oder Aminen zwei Mal mit Boratpuffer für 30 Minuten bei 5000 g (ca. 6410 Upm) im Sorvall-SS34-Festwinkelrotor gewaschen. Inkubation der Antikörperlösung mit 10 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin in DMSO, in einem Verhältnis von 100 µg Sulfo-NHS-Biotin pro mg Protein, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit Trispuffer beendet, anschliessend zweimal mit PBS zur Entfernung von nicht gebundenen Biotin gewaschen, Antikörper in PBS aufgenommen, die gewünschte Konzentration eingestellt und die Bindung an Immunglobuline in der Flußzytometrie überprüft.

2.3.11. Flußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ermöglichte durch Verwendung spezifischer, mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Antikörper, die quantitative Bestimmung der Prozentzahl von Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenantigen exprimieren. Durch einen Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Scan“ (FACScan®, Becton Dickinson) wurden die Farbstoffe zur Emission von Licht charakteristischer Wellenlänge angeregt, welches vom Gerät gemessen wurde. Es konnte Licht der Farbstoffe FITC (1. Fluoreszenz), PE (2. Fluoreszenz) und Streptavidin-Red 670™ (3. Fluoreszenz) detektiert werden. Zusätzlich konnten Aussagen über die Zellgröße („forward scatter“) und die Granulität („side scatter“) getroffen werden. Mit Hilfe der LYSISII® Software wurden die Färbungen analysiert und mit der Cell-Quest-Software für Apple-Macintosh ausgewertet.

Routinemäßig wurden 3×10^5 Zellen der Milzzellsuspension in 100 μ l FACS-Puffer mit OX33, einem murinen primären Antikörper, der eine LCA-Isoform erkennt, welche nur auf B-Zellen exprimiert wird, bzw. L180 als Negativprobe für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Waschen der Zellen mit 4 ml FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper D α Mlg-PE, welcher am primären Antikörper bindet für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, um die Färbung zu entwickeln. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und im FACScan® (Becton-Dickinson) ausgewertet.

In dieser Arbeit wurde die Flußzytometrie vor allem verwendet, um die Wirkung von mAk JJ316 auf die Zellen in vivo zu erkennen. Bei Ansprechen des Tieres auf den Antikörper kommt es durch die verstärkte Zellproliferation zu einer Vergrößerung der Zellen, welche im forward scatter nachgewiesen werden kann. Als Kontrolle einer ausreichenden in vivo- Behandlung wurde untersucht, ob mAk JJ316 bzw. JJ319 auf der Oberfläche von Zellen von behandelten Tieren bindet (M. Rodriguez-Palmero; unveröffentlichte Daten). Vergleichsuntersuchungen sollten mögliche Unterschiede zwischen einzelnen batches des mAk JJ316 zeigen. Vor seiner Verwendung wurde der gereinigte und biotinylierte MARK-1 auf seine Bindungseigenschaften untersucht.

3 Ergebnisse

Experimente mit dem mitogenen mAk JJ316 *in vitro* zeigten, dass die Stimulation über CD28 ohne zusätzliches Signal über den TZR zu einer deutlichen Proliferation aller T-Zellen [Tacke et al., 1997] führt („direkte Stimulation“), ein Effekt, der durch den konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 nicht auszulösen ist. G. Hanke konnte zeigen, dass Applikation von mAk JJ316 *in vivo* zu einer Proliferation von T-Zellen (v. a. CD4⁺-T-Zellen) und B-Zellen führt, mit der Folge, dass es zu einem Anstieg der IgG1-Konzentration kommt [Hanke, 1997], was Anzeichen für einen Wechsel der Immunantwort zu Th2-gewichteten Reaktionen wären. Im Rattenmodell würde neben dem Anstieg von IgG1 vor allem eine höhere Konzentration IgE und eine größere Menge von IgG2a eine Th2-gewichtete Immunantwort anzeigen, wohingegen IgG2b eher einer Th1-Antwort entspricht [Der Balian et al., 1980; Mosmann et al., 1989]. Weiterführende Untersuchungen der *in vivo* - Wirkung von JJ316, sowohl was den Einfluß auf die anderen Immunglobulinisotypen als auch zeitliche Verläufe der Immunglobulinproduktion betrifft, fehlten bislang.

Immunglobulin -subtyp	Zytokine	Immunantwort
IgG2b	IL-2 INF- γ	Th1
IgG2a IgG1	IL-4 IL-10 IL-13	Th2
IgE		

Tabelle 2: Immunglobulinsubtypen und entsprechende Zytokine bei TH-1- und TH-2-gewichteter Immunantwort

Die Untersuchungen wurden bei zwei unterschiedlichen Rattenstämmen durchgeführt, Brown-Norway- (BN-) Ratten und Lewis- (LEW-) Ratten. BN-Ratten reagieren auf Stimulation des Immunsystems verstärkt mit einer Th2-Antwort [Mathieson et al., 1992], wohingegen LEW-Ratten normalerweise Th1-gewichtet auf Antigene reagieren [Groen et al., 1993; Beijleveld et al., 1996]. In den Experimenten sollte festgestellt werden, ob eine Behandlung mit mAk JJ316 zu qualitativen Unterschieden der Immunantwort zwischen diesen Rattenstämmen führt. Um einen möglichen Einfluß des Alters zu berücksichtigen, wurden Jungtiere (1-3 Wochen), erwachsene Tiere (2-3 Monate) und alte Tiere (ca. 7-9 Monate) untersucht. Die Untersuchung der Zellzahl in Milz und Lymphknoten zeigte ein Maximum des Anstieges nach drei Tagen [Hanke, 1997]. Um den zeitlichen Verlauf der Immunantwort zu charakterisieren, wurden die Tiere zwei, fünf und zehn bzw. dreizehn Tage, sowie in einem Versuch über drei Wochen nach Applikation untersucht. Im letzten Teil wurde der Einfluß der Antikörpergabe auf zuvor mit einem

Modellantigen immunisierte Tiere getestet und auch hier auf Unterschiede bezüglich Alter und Stamm der Tiere geachtet.

Die Untersuchung der Immunglobuline erfolgte im Isotyp-spezifischen ELISA oder ELISPOT. Im ELISA wird die Antikörperkonzentration im Serum der Tiere untersucht. Im Gegensatz dazu wird im ELISPOT die Frequenz der antikörperproduzierenden B-Zellen nachgewiesen. Bei den Ergebnissen des ELISPOT-Assays ist es möglich, dass sich durch eine Umverteilung der B-Zellen im lymphatischen System nur ein Teil der immunglobulinbildenden Zellen in der Milz befindet. Daraus ergeben sich manchmal differierende Ergebnisse mit den beiden Nachweismethoden.

3.1. Untersuchung der Immunglobulinproduktion bei Brown-Norway-Ratten

Wie oben berichtet, reagieren BN-Ratten auf Stimuli ihres Immunsystems verstärkt mit einer Th2-gewichteten Immunantwort. Die Wirkung des mitogenen CD28-spezifischen mAK JJ316 wurde in den folgenden Versuchen mit der Behandlung mit dem konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 und R73 - einem TCR $\alpha\beta$ -spezifischen-Antikörper - verglichen. Als Kontrolle wurde PBS appliziert.

3.1.1. Wirkung der mAk JJ316 und JJ319 bei Gabe ab der Geburt

Bei Vorversuchen mit älteren Tieren zeigten sich gelegentlich Schwankungen der Serumtitel der Tiere. Da zuvor durchgemachte Antigenerfahrungen schon zu einer Polarisierung der Immunität und somit zu einer bestimmten Isotypzusammensetzung führen und bei den Untersuchungen miteinfließen, wurden BN-Ratten ab kurz nach ihrer Geburt untersucht.

Den Jungtieren wurde für vier Wochen nach ihrer Geburt steigende Mengen der mAk JJ316 und JJ319 (100 μ g-200 μ g-300 μ g-400 μ g / Woche) bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Jede Behandlungsgruppe enthielt drei Tiere beiderlei Geschlechts. Fünf Tage nach der letzten Gabe wurde Serum gewonnen, die Milz entfernt und mittels ELISA und ELISPOT die Immunantwort untersucht.

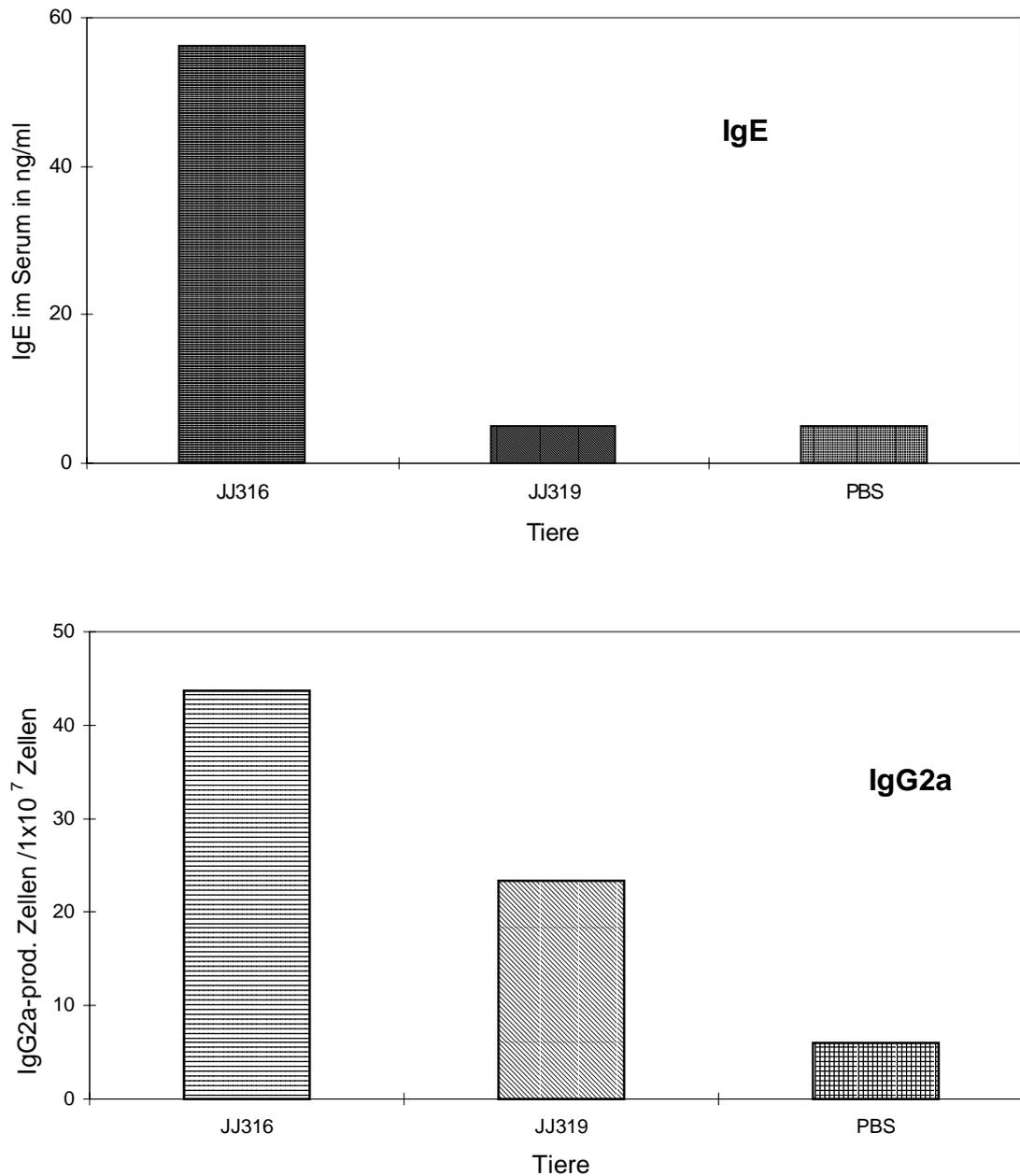


Abbildung 1: IgE-Titer und Frequenz der IgG2a-produzierenden Zellen bei BN-Ratten bei Behandlung mit mAk JJ316, JJ319 bzw. PBS für vier Wochen ab der Geburt

BN-Ratten wurde für vier Wochen nach Geburt jeweils 100µg-200µg-300µg-400µg / Woche mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Fünf Tage nach der letzten Inokulation wurde die Immunantwort untersucht. Dargestellt ist die IgE-Konzentration in ng/ml (oben) und die Frequenz Ig2a-produzierender Zellen im ELISPOT bei je 10⁷ Zellen/ml pro Napf (unten) als Mittelwert von zwei Tieren in der Behandlungsgruppe mit mAk JJ316 bzw. drei Tieren in der Gruppe mit mAk JJ319 oder PBS.

In der Behandlungsgruppe mit mAk JJ316 zeigte sich ein deutlicher Anstieg des IgE-Titers und der Frequenz der IgG2a-produzierenden Zellen (Abb.1) im Vergleich zu den Kontrollen. Die Behandlung mit JJ316 zeigte im IgG1- und IgG2a-spezifischen ELISA zwei- bzw. dreifach höhere Werte als die Kontrollgruppe mit PBS, allerdings waren die Titer auch bei den mit JJ319 behandelten Tieren erhöht. Die Frequenz der IgG2b-produzierenden Zellen entsprach im ELISPOT-Assay bei Behandlung mit mAk JJ316 der Kontrollgruppe, im ELISA lag der Titer des IgG2b deutlich unter den beiden Vergleichsgruppen (Abb. 2). Insgesamt führte die Gabe von mAk JJ316 in jungen BN-Ratten zu einer Verstärkung Th2-spezifischer Immunglobuline, wohingegen sich ein hemmender Effekt auf die Th1-Antwort zeigte.

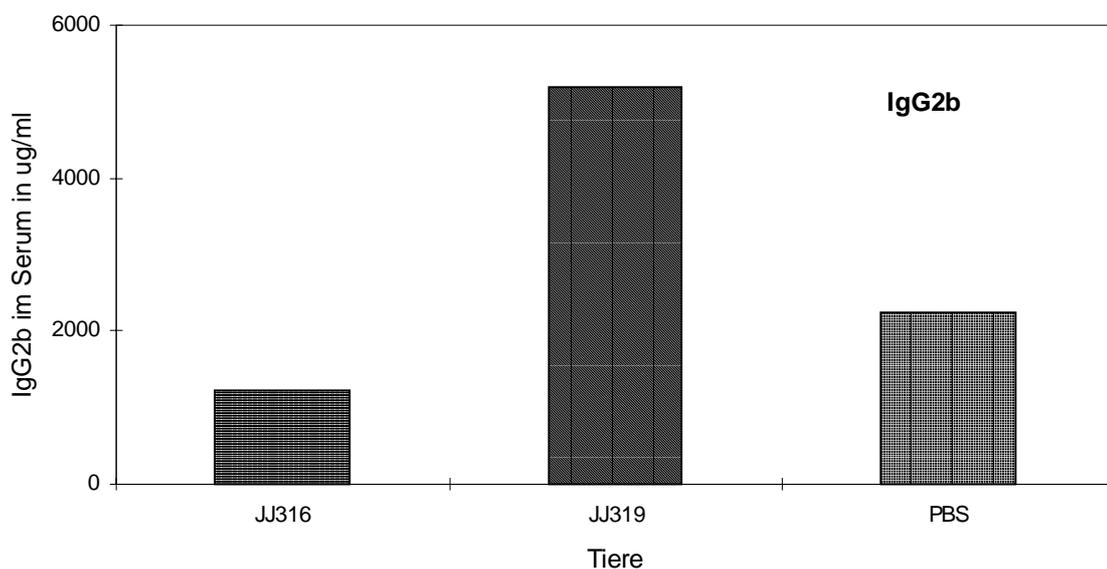


Abbildung 2: Ig2b-Titer bei BN-Ratten bei Behandlung mit mAk JJ316, JJ319 bzw. PBS für vier Wochen ab der Geburt

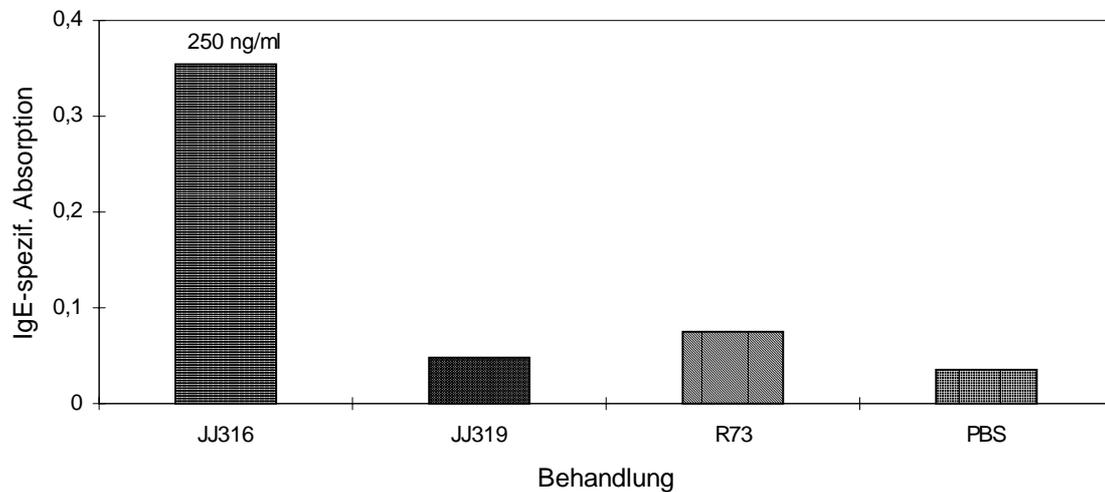
BN-Ratten wurde für vier Wochen nach Geburt jeweils 100µg-200µg-300µg-400µg / Woche mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Fünf Tage nach der letzten Inokulation wurde die Immunantwort untersucht. Dargestellt ist die Ig2b-Konzentration in ug/ml als Mittelwert von zwei Tieren in der Behandlungsgruppe mit mAk JJ316 bzw. drei Tieren in der Gruppe mit mAk JJ319 oder PBS.

3.1.2. Einfluß von mAk JJ316, JJ319 und R73 auf erwachsene Tiere

In Jungtieren zeigte die Behandlung mit mAk JJ316 einen deutlichen Anstieg der Th2-vermittelten Immunantwort. Im nächsten Schritt sollte der Einfluß auf neun Wochen alte Tiere und der Verlauf der Immunantwort an verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation der Antikörper untersucht werden. Den BN-Ratten wurde je 1 mg mAk JJ316, JJ319 oder R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Nach zwei, fünf bzw. dreizehn Tagen wurde die

Immunglobulinproduktion im ELISPOT bzw. die Serumkonzentration der Isotypen im ELISA untersucht.

IgE b. BN-Ratten an Tag 5



IgE-Verlauf

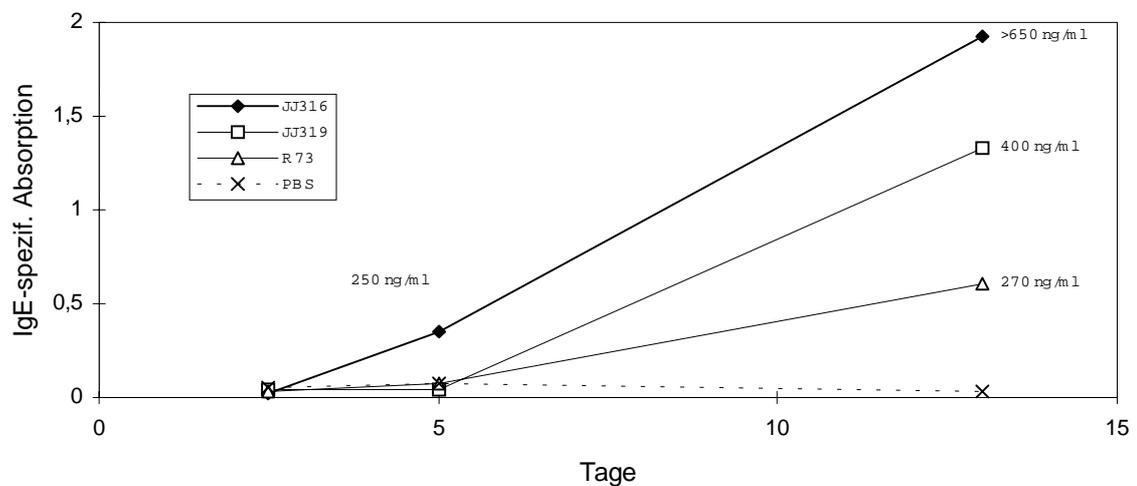


Abbildung 3: IgE-Titer bei neun Wochen alten BN-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS am Tag 5 und im Verlauf der Behandlung

Neun Wochen alte BN-Ratten wurden jeweils mit 1 mg JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Zwei, fünf und dreizehn Tage nach Applikation wurde die Immunantwort im ELISA untersucht. Dargestellt ist die Antikörperkonzentration im Serum nach fünf Tagen (oben) und der Verlauf der IgE-Konzentration über den gesamten Versuchszeitraum (unten). Die Werte entsprechen dem Mittelwert von je zwei Tieren einer Behandlungsgruppe. Es wurde die IgE-spezifische Absorption aufgetragen, da die Werte für JJ319, R73 und PBS an den Tagen zwei und fünf unterhalb der Standardkurve lagen und nur die Immunglobulinkonzentration für JJ316 berechnet werden konnte. Der Wert für die Behandlungsgruppe mit JJ316 am Tag 13 konnte nur näherungsweise angegeben werden, da er deutlich über den durchgeführten IgE-Standards lag.

Durch die Behandlung mit JJ316 kam es zu einem starken Anstieg von IgE im Serum. Fünf Tage nach Applikation lag die Gruppe schon deutlich über den Kontrollen. Im Verlauf zeigten auch die Behandlungsgruppen mit JJ319 und R73 höhere Werte (Abb. 3), wobei die Steigerung deutlich hinter der Produktionserhöhung bei JJ316 zurückblieb.

Am Tag 2 zeigten sich im ELISA noch keine signifikanten Unterschiede. Am fünften Tag stieg die IgG1- und IgG2a-Produktion in der Behandlungsgruppe mit mAk JJ316 (Abb. 4), v. a. im Vergleich zu der Behandlung mit JJ319 und PBS, wohingegen auch die Applikation von R73 zu einem Anstieg der Immunglobulinproduktion führte. Nach dreizehn Tagen zeigten sich keine grösseren Schwankungen zwischen den Antikörpertitern der einzelnen Gruppen. Die Produktion von IgG2b war an allen Tagen zwischen den Gruppen sehr ausgeglichen. Im ebenfalls durchgeführten ELISPOT zeigten sich keine nachweisbaren Unterschiede (Ergebnisse nicht gezeigt).

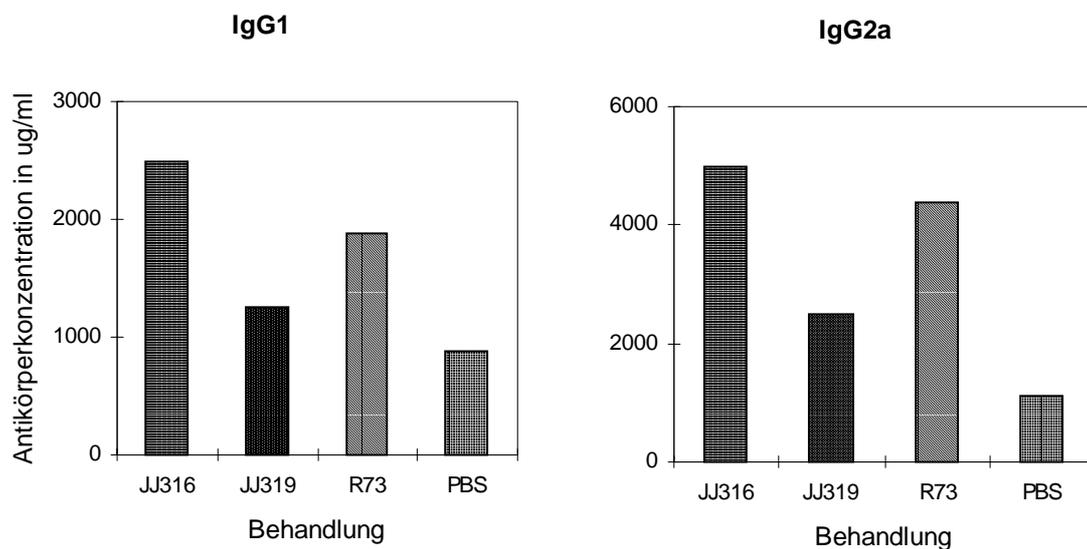


Abbildung 4: IgG1- und IgG2a-Titer bei neun Wochen alten BN-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS nach 5 Tagen

Neun Wochen alte BN-Ratten wurden jeweils mit 1 mg JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Nach fünf Tagen wurde die Immunantwort in einem IgG1- und IgG2a-spezifischen ELISA untersucht. Dargestellt ist die Antikörperkonzentration als Mittelwert von je zwei Tieren einer Behandlungsgruppe.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit dem mitogenen mAk JJ316 die IgE-Produktion deutlich steigern kann, ein Effekt, der durch den konventionellen mAk JJ319 nicht erreichbar ist. Gemeinsam mit der Produktionssteigerung bei IgG1 und IgG2a spricht dies erneut für eine Verstärkung der Th2-Immunantwort. Eine Unterdrückung der Th1-spezifischen IgG2b-Produktion konnte bei den neun Wochen alten BN-Ratten durch die Behandlung mit JJ316 nicht erreicht werden.

3.1.3. Effekt von JJ316, JJ319 und R73 bei älteren Tieren

Unterschiede in der Immunglobulinproduktion zeigten sich schon zwischen Jungtieren und neun Wochen alten Ratten. Aufgrund von früheren Antigenerfahrungen könnte eine Behandlung mit mAk JJ316 in höherem Lebensalter erneut eine andere Wirkung erzielen. Um diese Frage zu klären, wurden BN-Ratten im Alter von etwa acht Monaten in einem ähnlichen Versuchsablauf wie bei den neun Wochen alten Tieren mit den Antikörpern behandelt. Den Tieren wurde je 2 mg mAk JJ316, JJ319 oder R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert und nach zwei, fünf und zehn Tagen die Antikörperproduktion untersucht.

In den Isotyp-spezifischen ELISAs zeigte sich erneut ein deutlicher Anstieg des IgE im Serum (Abb. 5), der zehn Tage nach Applikation den höchsten Wert erreicht, wohingegen die anderen Isotypen nur geringe Unterschiede zeigten. Zwar wurde IgG1 am zweiten Tag etwas stärker in der Gruppe mit mAk JJ316 produziert, jedoch lag die Produktion ab Tag fünf bei allen Behandlungsgruppen auf einem vergleichbaren Niveau (Daten nicht gezeigt). Im IgE-spezifischen ELISPOT war die Frequenz der IgE-produzierenden Zellen an den Tagen zwei und fünf besonders hoch (Abb. 5), wohingegen nach zehn Tagen nur noch eine geringe Bildung vorlag. Einen ebenfalls höheren Wert an Tag fünf zeigte die Behandlungsgruppe mit mAk JJ316 für IgG2a (Abb. 7). Sowohl die Frequenz der IgG2b-produzierenden Zellen, als auch die IgG2b-Konzentration im Serum blieb im Verlauf in der Behandlungsgruppe mit JJ316 hinter den Tieren mit JJ319 bzw. R73 zurück (Abb. 6).

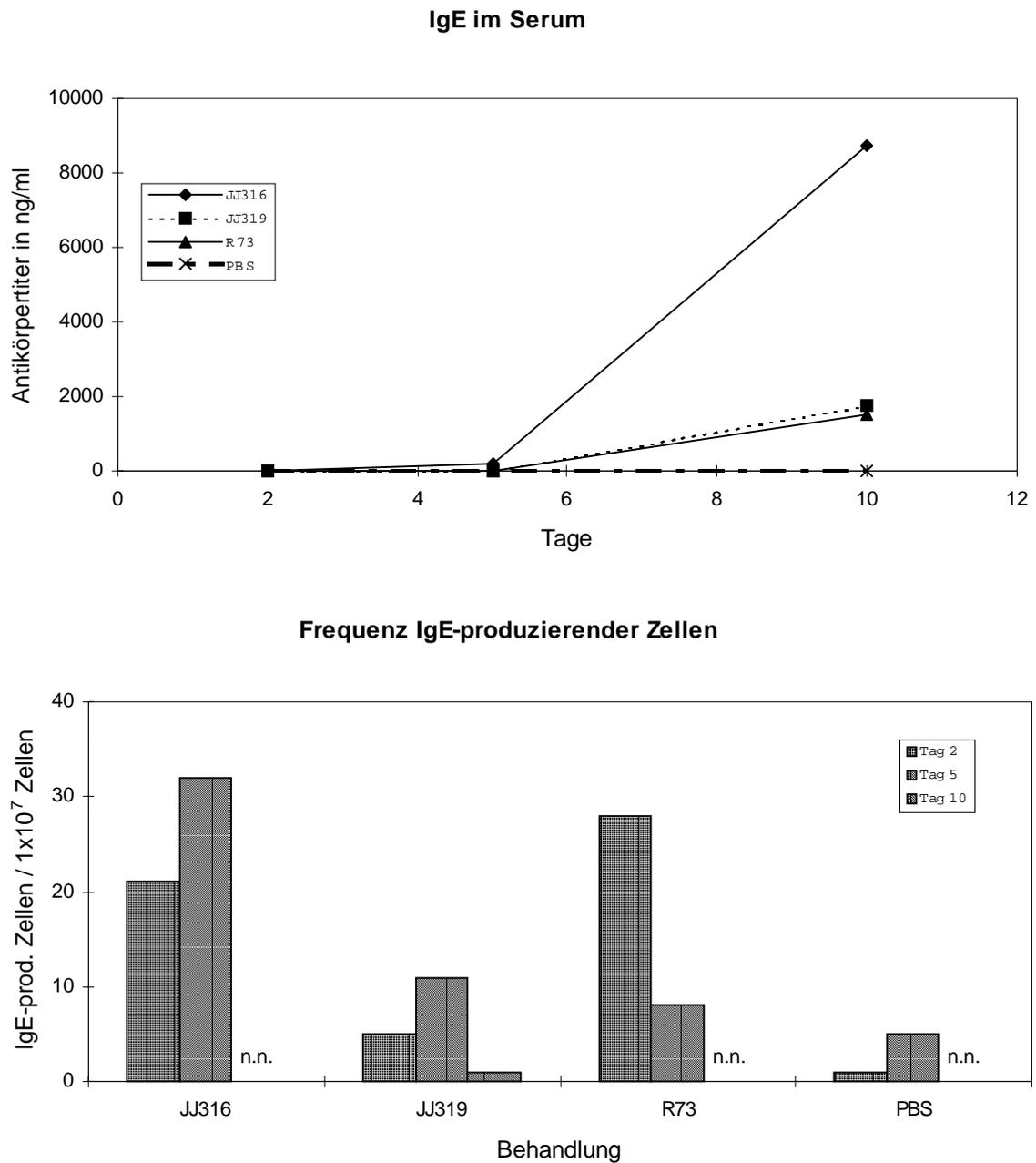


Abbildung 5: Verlauf des IgE-Titers und Frequenz der IgE-produzierenden Zellen bei älteren BN-Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit mAk JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS

Etwa acht Monate alte BN-Ratten wurden mit je 2 mg JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Am zweiten, fünften und zehnten Tag wurde die Immunantwort in ELISA und ELISPOT untersucht. Dargestellt ist der IgE-Serumtiter im Verlauf des Versuches (oben) und die Frequenz der IgE-produzierenden Zellen (unten) bei je 10^7 Zellen/ml pro Napf an den Untersuchungstagen als Mittelwert von je zwei Tieren einer Behandlungsgruppe.

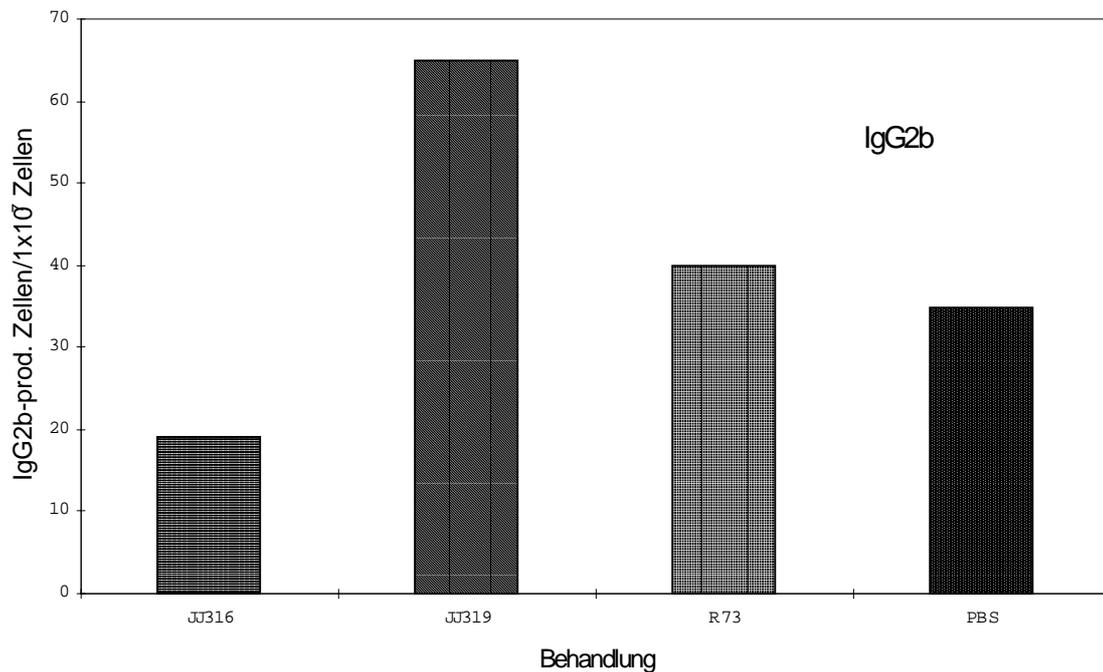
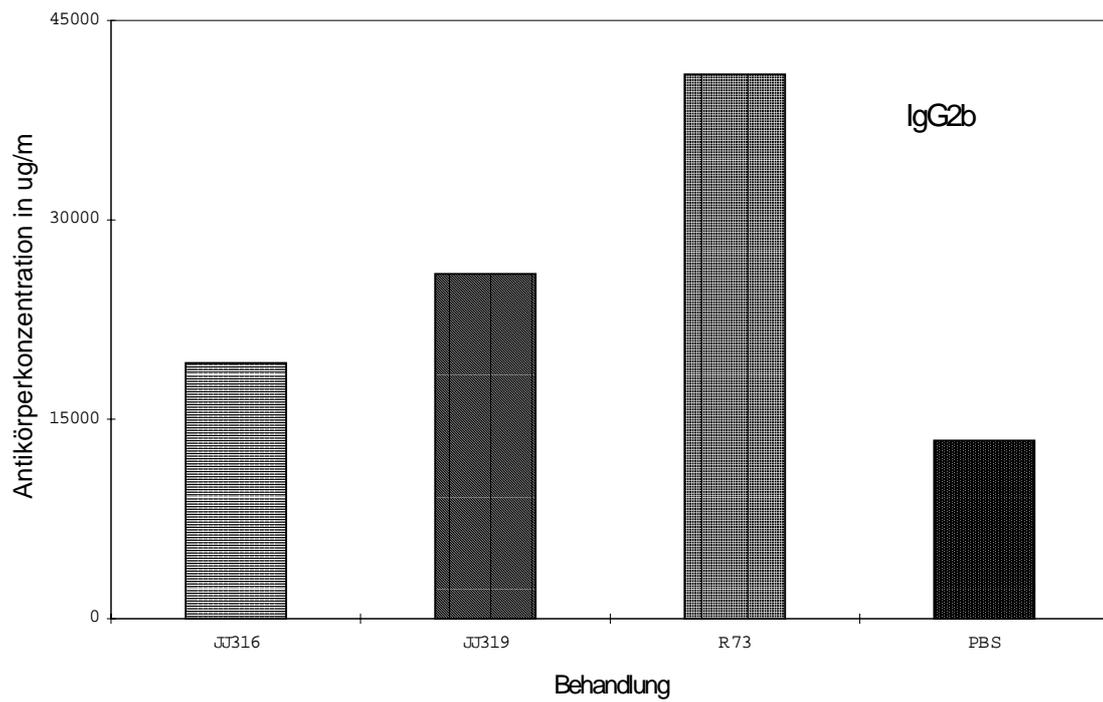


Abbildung 6: Ig2b-Konzentration und Frequenz der IgG2b-produzierenden Zellen bei älteren BN-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS an Tag 10

Etwa acht Monate alte BN-Ratten wurden mit je 2 mg JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. An Tag 10 wurde die Immunantwort im ELISA und ELISPOT untersucht. Dargestellt ist die IgG2b-Konzentration (oben) und die Frequenz der IgG2b-produzierenden Zellen (unten) bei je 10⁷ Zellen/ml pro Napf als Mittelwert von je zwei Tieren einer Behandlungsgruppe.

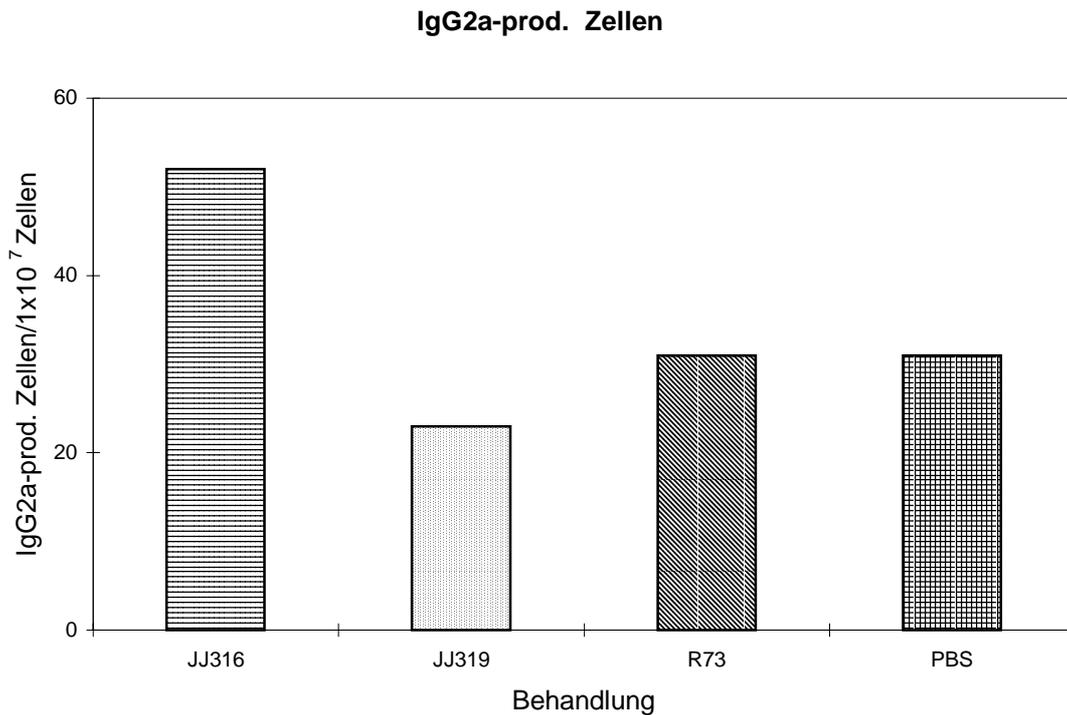


Abbildung 7: Frequenz der Ig2a-produzierenden Zellen bei älteren BN-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS an Tag 5. Etwa acht Monate alte BN-Ratten wurden mit je 2 mg JJ316, JJ319, R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. An Tag 5 wurde die Immunantwort im ELISPOT untersucht. Dargestellt ist die Frequenz der Ig2a-produzierenden Zellen bei je 10^7 Zellen/ml pro Napf als Mittelwert von je zwei Tieren einer Behandlungsgruppe.

In älteren BN-Ratten zeigte sich durch die Behandlung mit mAk JJ316 vor allem eine Beeinflussung der IgE-Produktion - in einem deutlichen Anstieg - und Veränderungen des IgG2b, welches sowohl im Serum in einer geringeren Konzentration nach Behandlung mit mAk JJ316 nachweisbar war, bei gleichzeitig geringerer Frequenz der IgG2b-produzierenden Zellen.

3.1.4. Untersuchung der Immunglobulinproduktion *in vitro*

Der Einfluß einer Behandlung mit mAk JJ316 wurde in den bisherigen Versuchen *in vivo* untersucht. Mit den gleichen Untersuchungsmethoden sollte nun die Wirkung *in vitro* auf die Immunantwort dargestellt werden. Ungetrennte Lymphknotenzellen einer neun Monate alten unbehandelten BN-Ratte wurden in 96-Napf-U-Platten ohne bzw. mit Zugabe von $5 \mu\text{g/ml}$ JJ316 in RPMI⁺ in Kultur genommen. An den Versuchstagen zwei, vier und sieben wurden die Überstände abgenommen und isotypspezifische ELISAs durchgeführt.

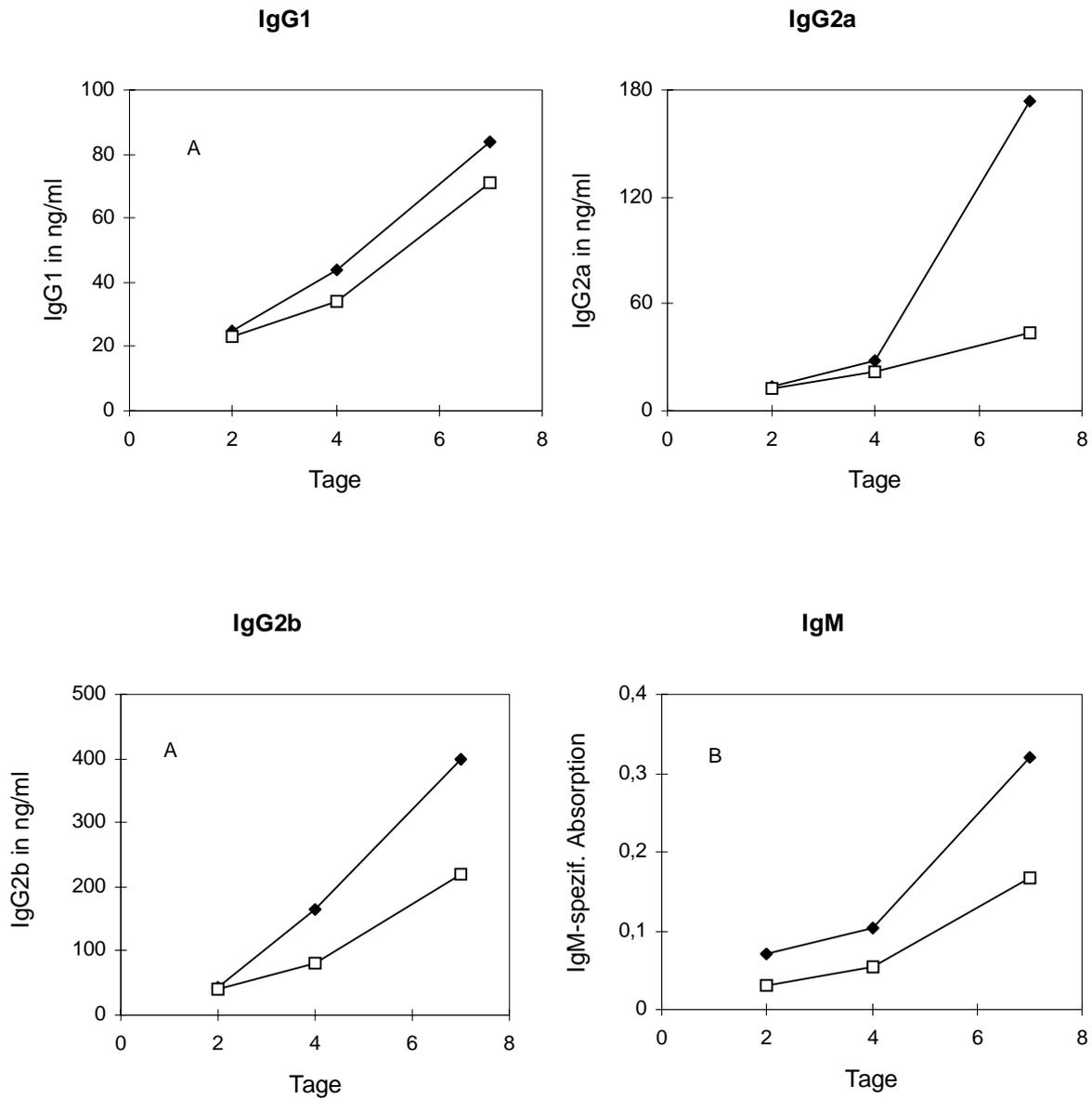


Abbildung 8: Einfluß von mAk JJ316 *in vitro* auf die Immunglobulinsubtypen-Produktion in ungetrennten Lymphknotenzellen einer unbehandelten BN-Ratte

Je 1×10^6 ungetrennte Lymphknotenzellen/ml einer unbehandelten BN-Ratte (ca. 9 Monate alt) wurden ohne bzw. mit $5 \mu\text{g/ml}$ JJ316 in RPMI⁺ Kultur gegeben. An den Tagen 2, 4 und 7 wurde jeweils der Überstand der Zellen abgenommen und ein Immunglobulinsubtypen-spezifisches ELISA durchgeführt. Dargestellt ist die IgG1-Konzentration (oben links), IgG2a (oben rechts), IgG2b (unten links) und die IgM-Konzentration (unten rechts) zu verschiedenen Zeitpunkten, jeweils für die Produktion mit Zugabe von mAk JJ316 (◆) bzw. ohne (□). Einschränkend ist zu beachten, dass sich in den Kulturen der nicht-stimulierten Zellen ebenfalls im Versuchsablauf Immunglobuline ansammeln.

Auch *in vitro* konnte die Verstärkung der Immunantwort durch mAk JJ316 nachgewiesen werden, wobei auch ein Anstieg des IgG2b zu erkennen ist, was normalerweise spezifisch für eine Th1-gewichtete Immunantwort wäre. Insgesamt zeigte JJ316 in dieser Versuchsreihe *in vitro* eine Vermehrung aller Immunglobulinsubtypen, so dass für einen Wechsel der Immunantwort wohl zusätzliche Faktoren benötigt werden, die *in vivo* vorliegen.

Wie in Tabelle 3 noch einmal zusammengefasst, zeigten die verschiedenen Versuchsreihen bei den Brown-Norway-Ratten insgesamt einen deutlichen Einfluss der Gabe des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 im Vergleich zum konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 auf die Immunantwort. In drei unterschiedlichen Altersgruppen - Jungtiere, erwachsene und ältere Tiere - zeigte sich *in vivo* eine Zunahme der Th-2-vermittelten B-Zellaktivierung, gekennzeichnet vor allem durch einen Anstieg des IgE, aber auch der Isotypen IgG1 und IgG2a, wohingegen die IgG2b-Produktion bei Jungtieren und erwachsenen Tieren *in vivo* geringere Werte als in den Kontrollgruppen aufweist. Bei Versuchen *in vitro* (bei alten Tieren) ergab Zugabe von mAk JJ316 zur Kultur eine generalisierte und nicht nur Th2-spezifische Zunahme der Immunglobulinproduktion.

	IgG1		IgG2a		IgG2b		IgE	
	JJ316	JJ319	JJ316	JJ319	JJ316	JJ319	JJ316	JJ319
Jungtiere	↑	↑	↑↑	↑	↓	↔	↑↑	↔
Erwachsene Tiere	↑	↔	↑	↔	↔	↔	↑↑	↑*
Alte Tiere	↑	↑	↑	↔	↑	↑	↑↑	↑**
<i>in vitro</i> ***	↑		↑↑		↑↑		n.n.	

Tabelle 3: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse bzgl. des Einflusses von mAk JJ316 auf die Immunantwort von BN-Ratten

Dargestellt ist in vereinfachter Weise die Wirkung der Gabe von mAk JJ316 bzw. JJ319 auf den Serumtiter bzw. die Frequenz immunglobulinproduzierender Zellen im Verhältnis zur Kontrollgruppe mit PBS. ↑↑= starker Anstieg; ↑=moderater Anstieg; ↔=keine Veränderung; ↓=Abfall

* Anstieg erst nach dreizehn Tagen; ** Anstieg erst nach zehn Tagen; *** Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander und nicht mit einer PBS-Kontrollgruppe; n.n.= nicht nachweisbar

3.2. Untersuchung der Immunglobulinproduktion bei Lewis-Ratten

Die vorausgegangenen Versuche haben gezeigt, dass durch die Gabe von mAk JJ316 bei BN-Ratten in vivo die Produktion Th2-spezifischer Immunglobuline erhöht wird. Da bekannt ist, dass BN-Ratten generell auf Stimulation ihres Immunsystems stärker mit einer Th2-Antwort reagieren, stellt sich die Frage, ob auch in LEW-Ratten - die normalerweise mit einer Th1-Reaktion antworten - die Behandlung mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 eine Th2-Antwort ausgelöst werden kann.

3.2.1. Wirkung der mAk JJ316 und JJ319 bei Applikation ab der Geburt

Ähnlich dem Versuchsablauf bei jungen BN-Ratten wurde zunächst die Wirkung von mAk JJ316 und JJ319 bei Gabe ab einer Woche nach Geburt untersucht. Anders als bei den vorausgegangenen Versuchen wurde in einer ersten Versuchsreihe die B-Zellaktivierung anhand der Immunglobulinproduktion jede Woche für insgesamt drei Wochen untersucht, in einem zweiten Ablauf nach insgesamt vier Wochen.

In einem ersten Schritt wurden die Immunglobulinsubtypen bei wöchentlicher Gabe steigender Dosen jede Woche für insgesamt drei Wochen bestimmt. LEW-Ratten beiderlei Geschlechts wurden in drei Versuchsgruppen eingeordnet. Die ersten Tiere erhielten eine Woche nach Geburt 100 µg mAk JJ316 bzw. JJ319 i.p. appliziert. Die zweite Gruppe erhielt nach einer Woche 100 µg und nach zwei Wochen 200 µg der Antikörper. Die letzte Behandlungsgruppe erhielt von der ersten bis zur dritten Woche postnatal je 100 µg, 200 µg und 300 µg pro Woche i.p. gespritzt. Je fünf Tage nach Applikation wurde Serum und Milz gewonnen und die B-Zell-Antwort in ELISA und ELISPOT untersucht.

Im ELISPOT zeigten die mit mAk JJ316 behandelten Jungtiere eine höhere Frequenz der immunglobulinproduzierenden Zellen für IgG2a und noch deutlicher für IgG1 als die mit mAk JJ319 behandelten Tiere (Abb. 9). Bei den jungen LEW-Ratten wurde auch der Isotyp IgG2b von der Gruppe mit JJ316 nach einer und nach drei Wochen stärker produziert (Abb. 9). Deutlich höher auch die Frequenz der IgE-produzierenden Zellen bei Behandlung mit JJ316, wobei in den Jungtieren mit Hilfe des ELISPOTS nur sehr wenig nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

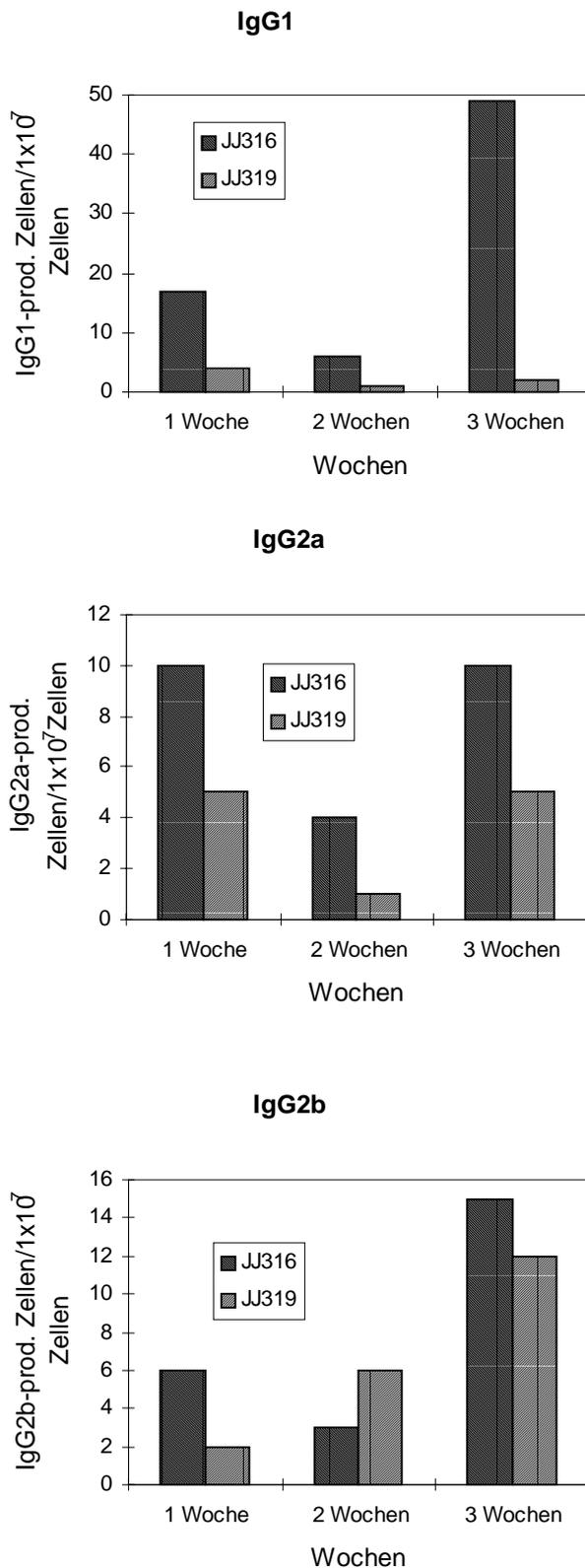


Abbildung 9: Frequenz der IgG1-, IgG2a- und IgG2b- produzierenden Zellen bei LEW-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316 und JJ319 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Geburt

LEW-Ratten beiderlei Geschlechts wurde ab einer Woche postnatal mAk JJ316 bzw. JJ319 appliziert. Die erste Behandlungsgruppe erhielt nach einer Woche 100 μ g JJ316 bzw. JJ319 i.p. Die zweite Gruppe wurde nach einer Woche mit 100 μ g, nach zwei Wochen mit 200 μ g JJ316 bzw. JJ319 i.p. gespritzt. Der dritten Gruppe wurde nach einer Woche 100 μ g, nach zwei Wochen 200 μ g und nach drei Wochen 300 μ g der Antikörper appliziert. Jeweils fünf Tage nach der Inokulation wurde die Immunantwort mittels ELISPOT untersucht. Dargestellt ist die Frequenz der IgG1- (oben), IgG2a- (Mitte) und IgG2b- (unten) produzierenden Zellen nach ein, zwei bzw. drei Wochen.

Im ELISA zeigten sich deutliche Unterschiede der IgG1- und IgE-Konzentration im Serum: die Applikation von mAk JJ316 führte - bei gleichen Ausgangswerten nach einer Woche - zu einem starken Anstieg der IgG1 und IgE-Titer im Vergleich zur Behandlung mit JJ319 (Abb. 10). Ausgeglichen waren die nachgewiesenen IgG2a-Titer im Serum, der Isotyps IgG2b war in diesen Tieren nur sehr gering nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

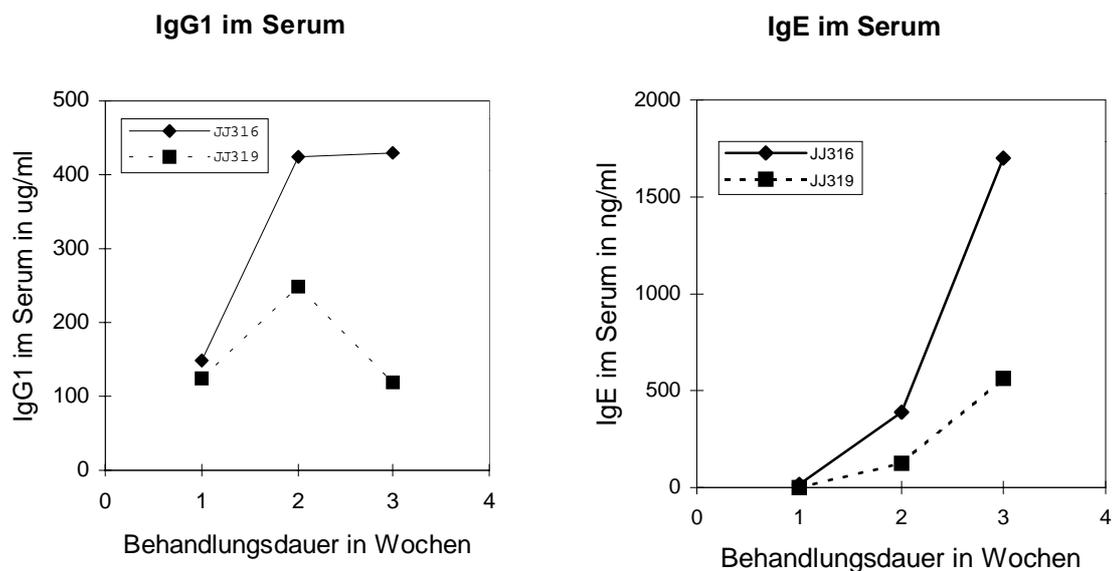


Abbildung 10: Verlauf des IgG1- und IgE-Serumtiters bei LEW-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316 und JJ319 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Geburt

LEW-Ratten beiderlei Geschlechts wurde ab einer Woche postnatal mAkJJ316 bzw. JJ319 appliziert. Die erste Behandlungsgruppe erhielt nach einer Woche 100 µg JJ316 bzw. JJ319 i.p. Die zweite Gruppe wurde nach einer Woche mit 100 µg, nach zwei Wochen mit 200 µg JJ316 bzw. JJ319 i.p. gespritzt. Der dritten Gruppe wurde nach einer Woche 100 µg, nach zwei Wochen 200 µg und nach drei Wochen 300 µg der Antikörper appliziert. Jeweils fünf Tage nach der Inokulation wurde die Immunantwort im ELISA untersucht. Dargestellt ist der Verlauf des IgG1- (links) und IgE- (rechts) Serumtiters nach ein, zwei bzw. drei Wochen.

Die jungen LEW-Ratten zeigten ähnlich wie die zuvor untersuchten BN-Ratten bei bis zu dreiwöchiger Behandlung nach Geburt eine deutlich verstärkte Th2-Antwort mit mAk JJ316 im Vergleich zum konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Immunantwort im Vergleich mit einer PBS-Kontrollgruppe nach vier Wochen untersucht. LEW-Ratten beiderlei Geschlechts wurde ab der ersten Woche nach Geburt jede Woche mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Die Tiere erhielten steigende Mengen von 100 µg bis 400 µg pro Woche. Fünf Tage nach der letzten Gabe wurde die Immunglobulinproduktion als Folge dieser Stimulation untersucht.

Bei der Untersuchung der Serumtitere der Immunglobuline im ELISA zeigten sich vor allem Unterschiede bei IgG1 und IgE. Die Produktion von IgG1 wurde durch mAk JJ316 im Vergleich zur Kontrolle fast verdoppelt (Abb. 11), wohingegen die Gabe von mAk JJ319 einen etwas geringeren Wert als die Kontrollgruppe ergab. Ausgeglichene Serumwerte ergaben sich für IgG2a. Einen höheren Antikörpertiter des Isotyps IgG2b hatten die Behandlungsgruppen mit mAk JJ319 und PBS, wohingegen die Behandlung mit mAk JJ316 zu einem im Vergleich zur Kontrolle niedrigeren IgG2b führte (Abb. 11). Eine sehr hohe IgE-Produktion zeigte eines der Tiere aus der JJ316-Gruppe. Allerdings lagen auch die beiden anderen Tiere etwa 25mal höher als die Kontrollgruppen. Aufgrund der Unterschiede zwischen den Tieren, wurden die Ergebnisse für IgE einzeln dargestellt (Abb. 11).

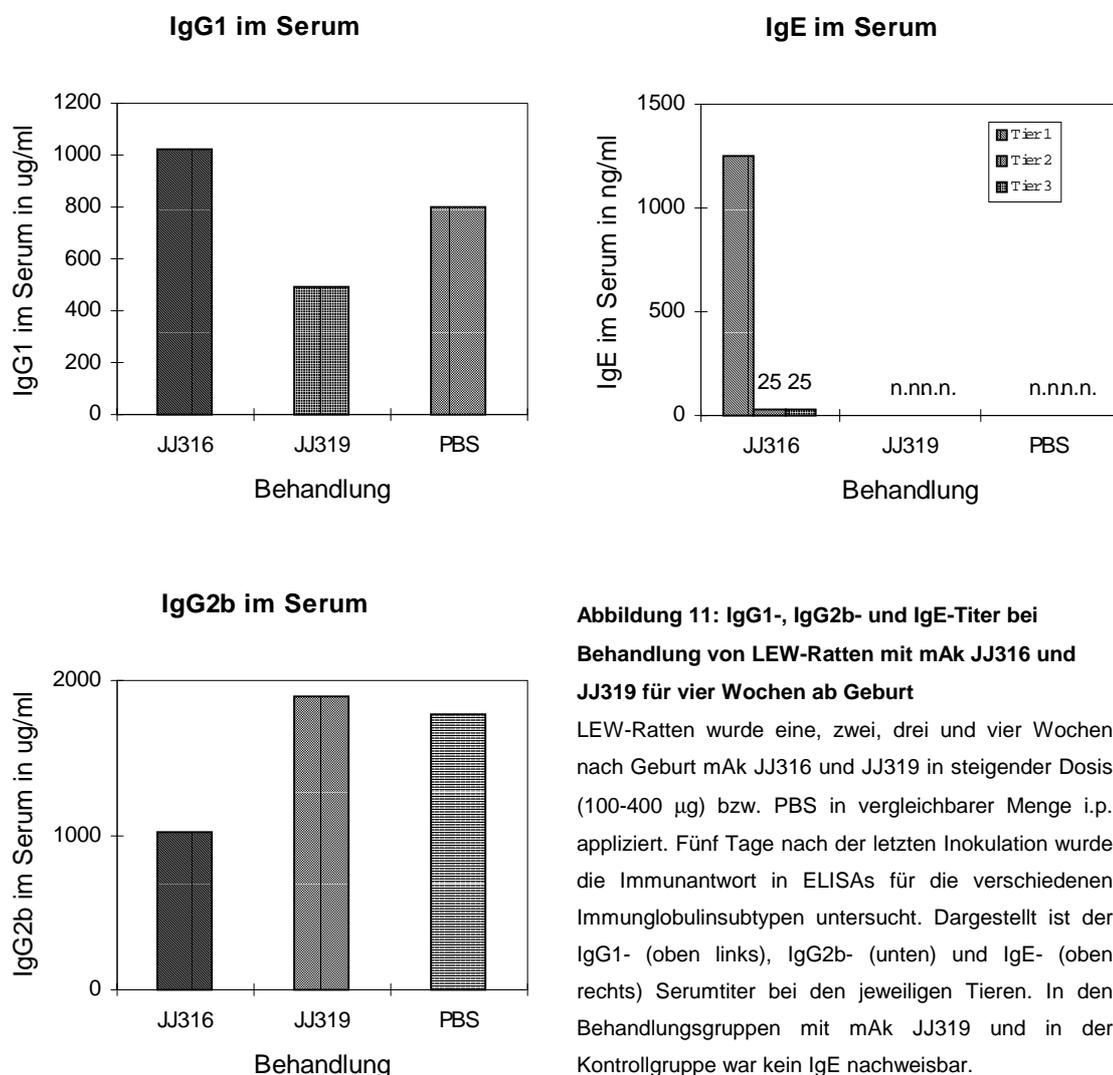


Abbildung 11: IgG1-, IgG2b- und IgE-Titer bei Behandlung von LEW-Ratten mit mAk JJ316 und JJ319 für vier Wochen ab Geburt

LEW-Ratten wurde eine, zwei, drei und vier Wochen nach Geburt mAk JJ316 und JJ319 in steigender Dosis (100-400 µg) bzw. PBS in vergleichbarer Menge i.p. appliziert. Fünf Tage nach der letzten Inokulation wurde die Immunantwort in ELISAs für die verschiedenen Immunglobulinsubtypen untersucht. Dargestellt ist der IgG1- (oben links), IgG2b- (unten) und IgE- (oben rechts) Serumtiter bei den jeweiligen Tieren. In den Behandlungsgruppen mit mAk JJ319 und in der Kontrollgruppe war kein IgE nachweisbar.

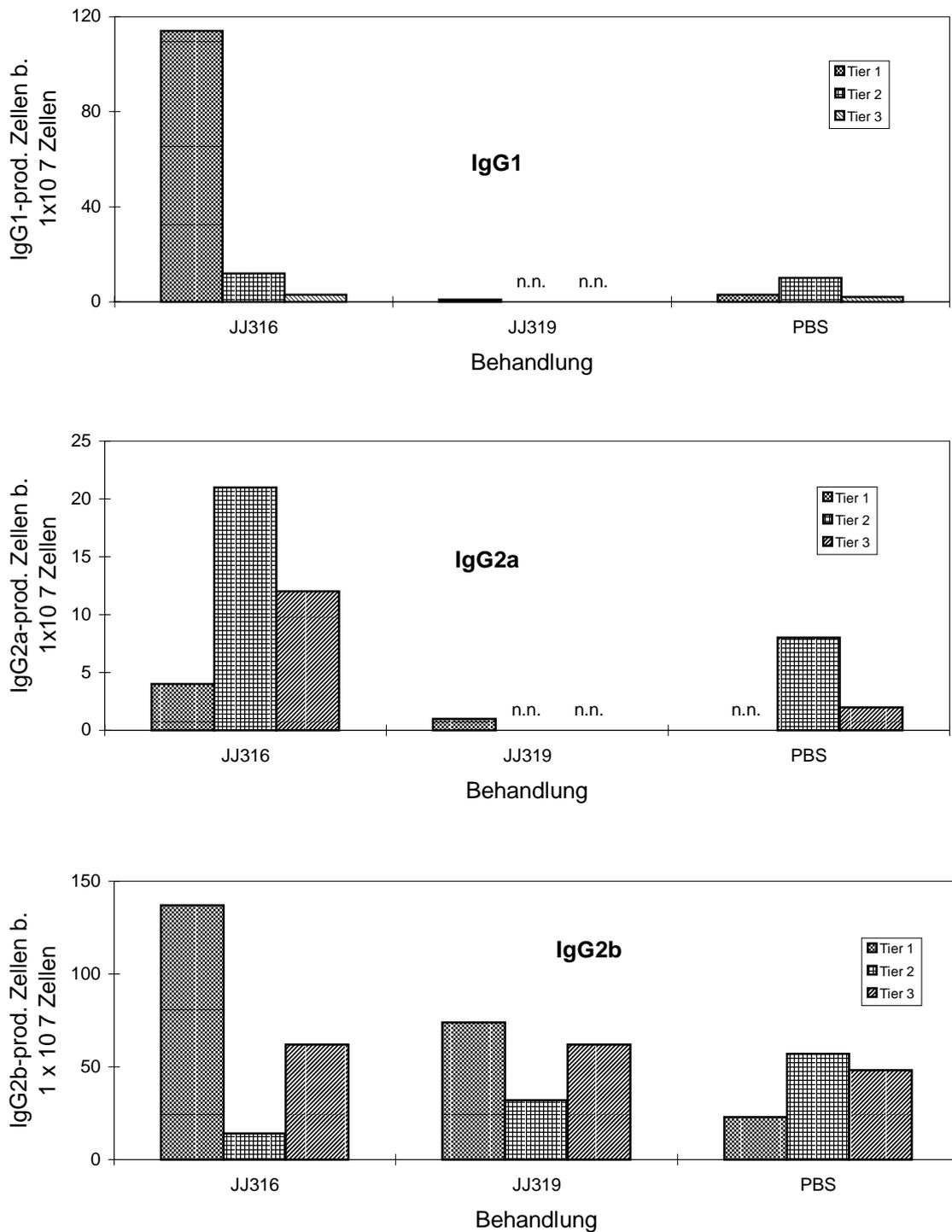


Abbildung 12: Frequenz der IgG1- und IgG2a-produzierenden Zellen bei Behandlung von LEW-Ratten mit mAk JJ316 und JJ319 für vier Wochen ab Geburt

LEW-Ratten wurde eine, zwei, drei und vier Wochen nach Geburt mAk JJ316 und JJ319 in steigender Dosis (100-400 µg) bzw. PBS in vergleichbarer Menge i.p. appliziert. Fünf Tage nach der letzten Inokulation wurde die Immunantwort in ELISPOT-Assays für die verschiedenen Immunglobulinsubtypen untersucht. Dargestellt ist die Frequenz der antikörperproduzierenden Zellen - IgG1 (oben), IgG2a (Mitte) und IgG2b (unten) - aufgrund der Unterschiede für die einzelnen Tiere getrennt.

Die Frequenz der antikörperproduzierenden Zellen im ELISPOT zeigte vor allem bei einem Tier aus der Behandlungsgruppe mit mAk JJ316 einen starken Anstieg. Wegen der Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren wurden die Ergebnisse für jedes Tier einzeln dargestellt. Im ELISPOT war die Frequenz der IgG1-produzierenden Zellen in einem Tier der JJ316-Behandlung deutlich erhöht. Dieses Tier zeigte auch den stärksten Anstieg beim Isotyp IgG2a, wobei auch die beiden anderen Tiere dieser Behandlungsgruppe über der Gruppe mit mAk JJ319 und der Kontrolle mit PBS lagen. Ein ausgeglichenes Bild zeigt sich im ELISPOT für IgG2b, wobei aber hier die Produktion durch mAk JJ316 bei einem Tier verstärkt wird (Abb. 12).

Bei LEW-Ratten, die kurz nach Geburt mit mAk JJ316 behandelt werden, führt dieser Antikörper zu einer höheren Produktion von IgE und IgG1 und somit zu einer Verstärkung der Th2-Antwort, trotz der normalerweise stärker Th1-gewichteten Immunantwort dieser Tiere. Ähnlich wie bei den Brown-Norway-Ratten wurde nun die Wirkung bei erwachsenen und älteren Tieren untersucht.

3.2.2. Einfluss von mAk JJ316 und JJ319 auf erwachsene LEW-Ratten

Bei neun Wochen alten BN-Ratten führte die Gabe von mAk JJ316 zu einer deutlichen Steigerung der IgE-Synthese. Zur Untersuchung des Einflusses auf LEW-Ratten wurden drei Monate alte Tiere mit einer Einzeldosis mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. behandelt und nach fünf Tagen die Immunantwort untersucht.

Abbildung 13 zeigt, dass die Gabe von mAk JJ316 einen deutlichen Anstieg der Frequenz immunglobulinproduzierender Zellen im ELISPOT der Isotypen IgG1 und IgG2a gegenüber der Gruppe mit JJ319 auslöst. Die Behandlungsgruppe mit dem konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 verblieb auf dem niedrigen Niveau der Kontrollgruppe. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich auch für IgG2b, wobei die Produktion insgesamt niedrig blieb (Abb. 13). Eine Untersuchung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum und auch der Frequenz der IgE-produzierenden Zellen wurde in dieser Versuchsreihe nicht durchgeführt.

Diese Ergebnisse konnten in der Messung der individuellen Antikörperkonzentrationen im Serum bei LEW-Ratten über drei Wochen (siehe 3.4.) und bei Untersuchungen an mit OVA-immunisierten Tieren bestätigt werden. In dieser Versuchsreihe wurde auch eine IgE-Bestimmung durchgeführt.

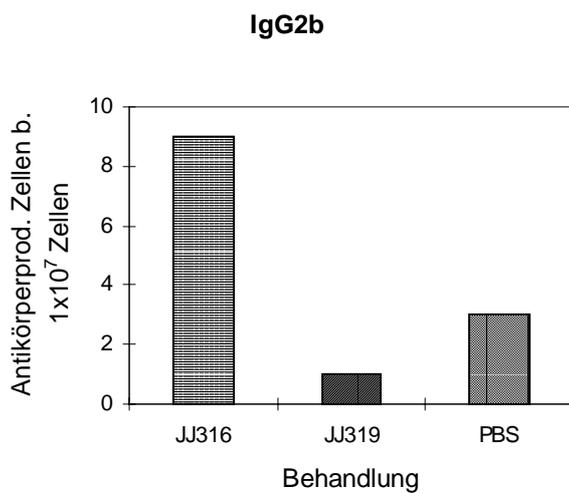
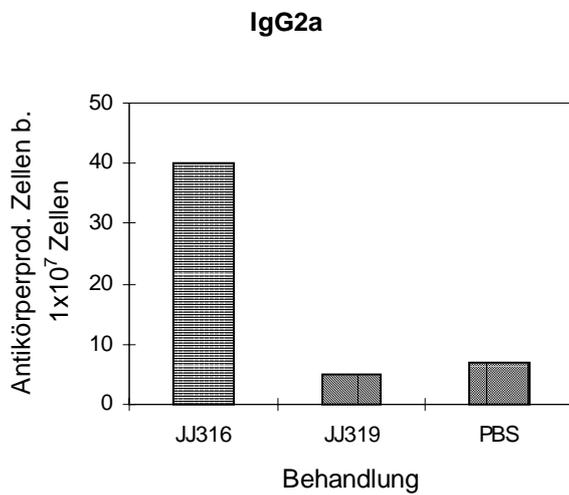
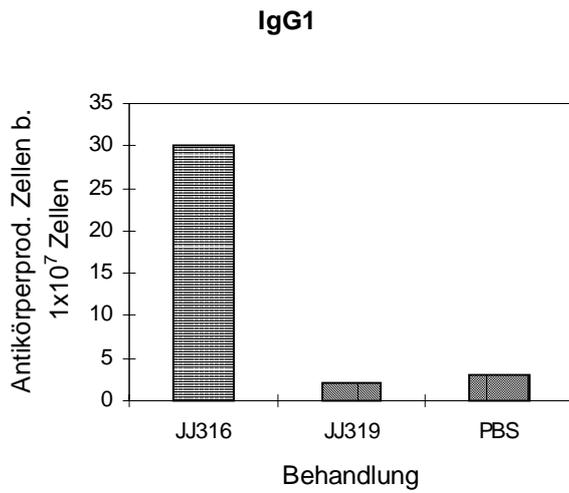


Abbildung 13: Frequenz IgG1-, IgG2a- und IgG2b-produzierender Zellen bei erwachsenen LEW-Ratten nach Behandlung mit einer Einzeldosis mAk JJ316 und JJ319

Drei Monate alte LEW-Ratten beiderlei Geschlechts wurden 2 mg mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Fünf Tage nach Injektion wurde die Immunantwort untersucht. Dargestellt ist die Frequenz der IgG1- (oben), IgG2a- (Mitte) und IgG2b- (unten) produzierenden Zellen

Insgesamt zeigte sich, dass die Behandlung mit mAk JJ316 in den Versuchsreihen mit erwachsenen LEW-Ratten zu einer stärkeren Produktion von IgG1 und IgG2a führte, also auch hier eine Th2-spezifische B-Zell-Antwort ausgelöst werden konnte. Ähnlich wie bei den Jungtieren zeigt sich - wenngleich auch auf insgesamt niedrigem Niveau - ein Einfluss auf die IgG2b-Produktion.

3.2.3. Effekt von JJ316, JJ319 und R73 bei alten Tieren

Der Einfluß der mAk JJ316 und JJ319 wurde auch an alten LEW-Ratten untersucht und mit der Wirkung von mAk R73 verglichen. Den ca. acht Monate alten Tieren wurde 2 mg des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316, des konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 oder des TZR-bindenden R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Zwei, fünf und zehn Tage nach Inokulation wurde die Antikörperproduktion untersucht.

Bei den alten Tieren zeigten sich außer für den Isotyp IgE nur geringe Unterschiede in den einzelnen Gruppen. Im zehntägigen Verlauf kam es zu einem deutlichen Anstieg der IgE-Serumkonzentration der mit mAk JJ316 behandelten Tiere, wohingegen sowohl die Behandlungsgruppe mit mAk JJ319 als auch die Tiere mit der Applikation von R73 auf dem Niveau der PBS-Kontrollgruppe blieben (Abb. 14).

Im ELISPOT stieg die Frequenz der IgE-produzierenden Zellen durch die Gabe von mAk JJ316 vor allem am zweiten Tag stark an, wobei auch durch die Behandlung mit R73 ein vermehrtes Auftreten des Isotyps sichtbar wurde (Abb. 14). Nach fünf Tagen nahm die Frequenz bei allen Tieren ab, wobei in der Gruppe mit JJ316 noch eine leicht höhere Frequenz der IgE-produzierenden Zellen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Am zehnten Versuchstag war bei allen Tieren nur noch eine sehr geringe Produktion zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Frequenz der produzierenden Zellen zeigte für IgG1, IgG2a und IgG2b keine größeren Unterschiede. Im ELISA lag der IgG1-Titer am zweiten und fünften Tag in der Behandlungsgruppe JJ316 über den anderen Tieren, sank aber an Tag 10 auf ein vergleichbares Niveau ab (Daten nicht gezeigt). Die IgG2a- und IgG2b-Konzentration im Serum lag bei den verschiedenen Tieren etwa auf gleicher Höhe (Daten nicht gezeigt).

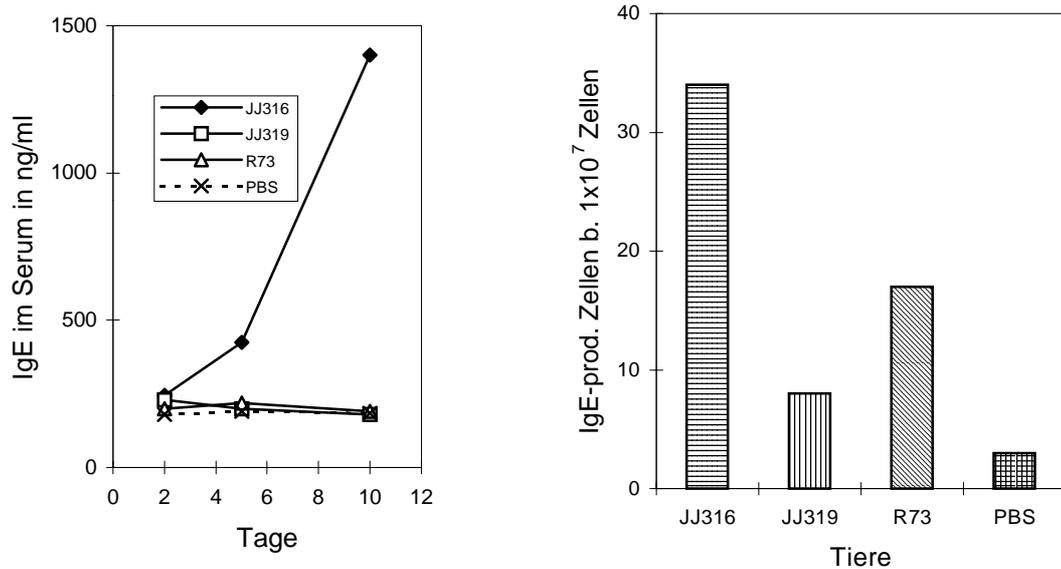


Abbildung 14: Verlauf des IgE-Titers bei alten LEW-Ratten und Frequenz der IgE-produzierenden Zellen nach Behandlung mit einer Einzeldosis mAk JJ316, JJ319 und R73

Alten LEW-Ratten beiderlei Geschlechts wurde 2 mg mAk JJ316, JJ319 oder R73 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Zwei, fünf oder zehn Tage nach Applikation wurde die Immunantwort mit ELISA (links) bzw. ELISPOT (rechts) untersucht. Dargestellt ist der IgE-Titer im ELISA (links) am Tag zwei, fünf und zehn (Wert entspricht an Tag zwei in der mit PBS behandelten Gruppe dem Mittelwert von zwei Tieren, bei den Behandlungsgruppen mit mAk JJ316, JJ319 und R73 je einem Tier, an den Tagen fünf und zehn den Mittelwerten von je zwei Tieren einer Behandlungsgruppe). Rechts ist die Frequenz der IgE-produzierenden Zellen im ELISPOT.

Die Wirkung von JJ316 war bei den alten LEW-Ratten im Hinblick auf eine mögliche Verringerung der IgG2b-Konzentration nicht so deutlich ausgeprägt wie in den vorhergehenden Versuchsreihen. Eventuell nimmt die Bereitschaft für eine - für diesen Ratten-Stamm eigentlich untypische - Th2-gewichtete Immunantwort mit höherem Lebensalter ab. Andererseits war die Wirkung auf die IgE-Produktion sehr deutlich zu sehen. Möglicherweise sind vorausgegangene Antigenerfahrungen ein Grund, dass diese Tiere ausgeglichene Immunglobulinkonzentrationen im Serum für alle anderen Isotypen aufweisen und nur bei dem normalerweise sehr gering vorhandenen IgE eine Wirkung durch Gabe von mAk JJ316 zu deutlich erkennbaren Unterschieden führte.

3.2.4. Untersuchung des Einfluß von mAk JJ316 und JJ319 auf die Immunglobulin-produktion einzelner LEW-Ratten über drei Wochen

Bei den zuvor durchgeführten Versuchsreihen wurde die Immunantwort verschiedener Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Mögliche individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Tieren aufgrund vorausgegangener Antigenerfahrungen - vor allem bei erwachsenen und alten Tieren - waren bisher nicht nachweisbar. Um den individuellen Verlauf der Immunglobulinantwort nach Behandlung mit mAk JJ316 und JJ319 besser darstellen zu können, wurden deshalb in dieser Versuchsreihe drei Monate alte LEW-Ratten über drei Wochen longitudinal untersucht.

Die Tiere wurden in Behandlungsgruppen zu je drei Tieren eingeteilt. Zu Beginn des Versuches wurde den Tieren Blut entnommen und ein Ausgangswert des jeweiligen Immunglobulins bestimmt. Anschließend erhielten die Tiere mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Am ersten, dritten, fünften, siebten, zehnten, zwölften, sechzehnten und einundzwanzigsten Tag nach Inokulation wurde den Tieren erneut Blut entnommen und die Serumkonzentrationen der Isotypen der Immunglobuline bestimmt.

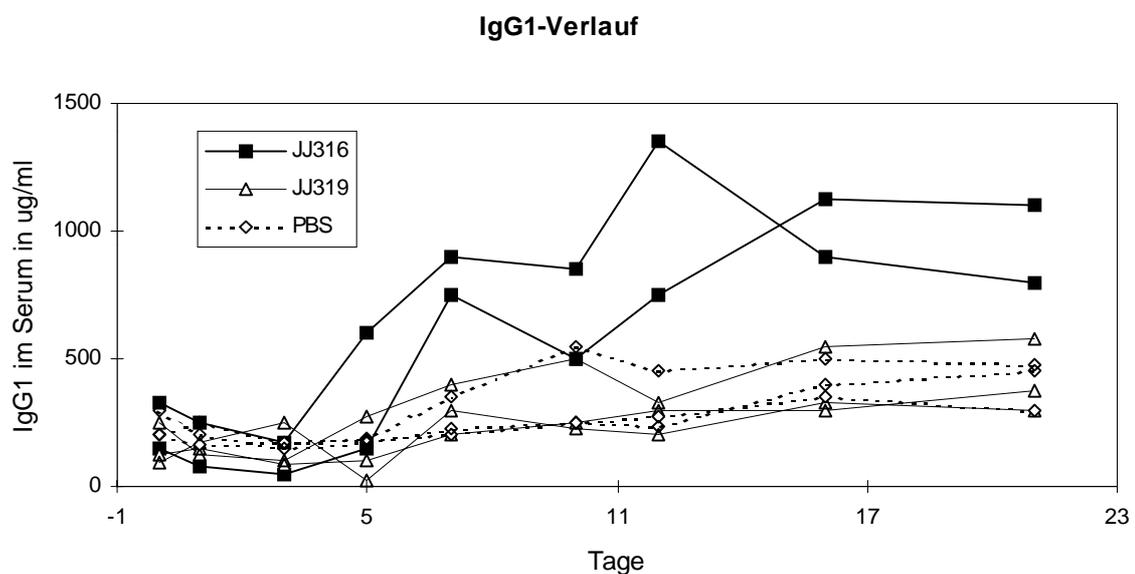


Abbildung 15: Verlauf des IgG1-Titers bei erwachsenen LEW-Ratten nach Applikation von mAk JJ316 oder JJ319

Erwachsenen LEW-Ratten wurde eine Einzeldosis von 2mg des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316, des konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Vor der Inokulation bzw. nach einem, drei, fünf, sieben, zehn, zwölf, sechzehn und einundzwanzig Tagen wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, das Serum gewonnen und ein IgG1-spezifischer ELISA durchgeführt. Dargestellt ist der Verlauf des IgG1-Serumtiters zu verschiedenen Zeitpunkten für die Tiere behandelt mit JJ316 (■); JJ319 (Δ) und PBS (◇).

Die Behandlung mit mAk JJ316 brachte einen deutlichen Anstieg von IgG1 im Serum zwischen dem fünften und zwölften Tag nach Applikation. In Abbildung 15 sind die individuellen Verläufe der behandelten Tiere abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Ausgangswerte der Tiere auf einem etwa gleichen Niveau liegen. Am Tag fünf kommt es zu einem starken Anstieg der IgG1-Konzentration im Serum bei den Tiere der Behandlungsgruppe mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316. Leichte Schwankungen zeigte auch die Behandlungsgruppe mit dem konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 und die Kontrollgruppe mit PBS, wobei zu beachten ist, dass die Gesamtkonzentration bei diesen beiden Gruppen um etwa die Hälfte geringer war als bei JJ316.

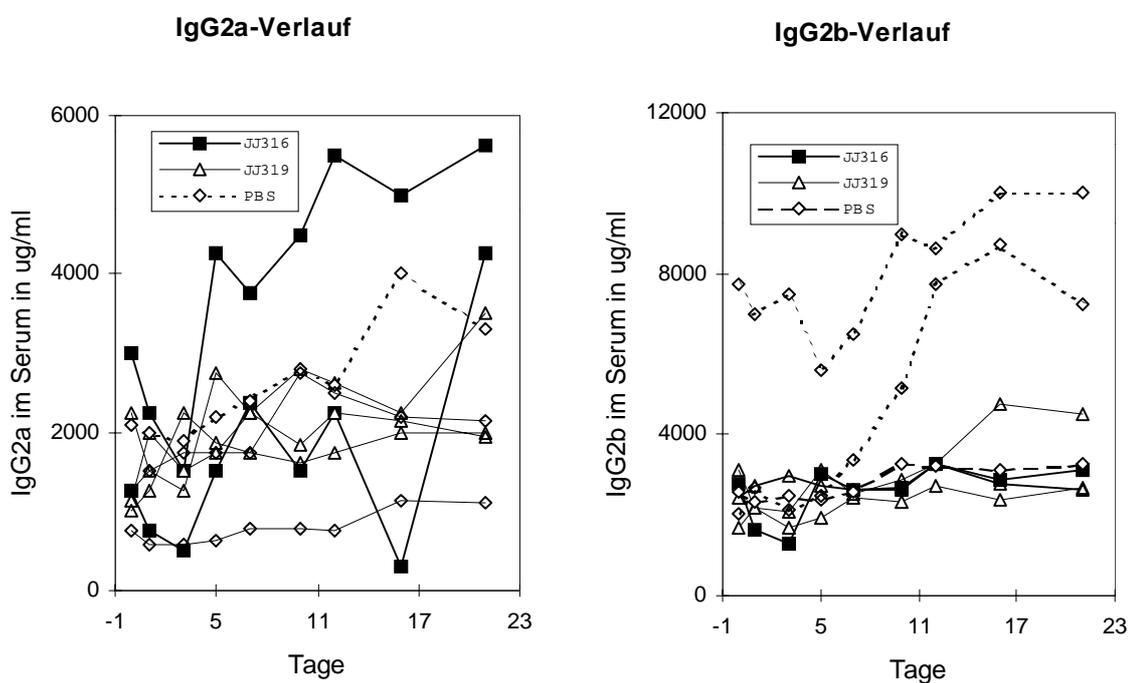


Abbildung 16: Verlauf des IgG2a- und IgG2b-Titers bei erwachsenen LEW-Ratten nach Applikation von mAk JJ316 oder JJ319

Erwachsenen LEW-Ratten wurde eine Einzeldosis von 2mg des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316, des konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Vor der Inokulation bzw. nach einem, drei, fünf, sieben, zehn, zwölf, sechzehn und einundzwanzig Tagen wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, das Serum gewonnen und ein IgG2a- und IgG2b-spezifischer ELISA durchgeführt. Dargestellt ist der Verlauf des IgG2a- (links) und des IgG2b- (rechts) Seruntiters zu verschiedenen Zeitpunkten für die Tiere behandelt mit JJ316 (■); JJ319 (△) und PBS (◇).

Einen geringeren Anstieg zeigte der IgG2a-Serumtiter nach Behandlung mit mAk JJ316. Nur ein Tier produzierte ab Tag fünf - bei wiederum ausgeglichenen Ausgangswerten im Vergleich zu den beiden anderen Behandlungsgruppen - verstärkt Antikörper dieses Isotyps, wohingegen das zweite Tier aus dieser Gruppe starke Schwankungen zeigt. Die Kontrollgruppe und

Behandlungsgruppe mit JJ319 blieb im Verlauf des Versuches auf einem relativ konstanten Niveau (Abb. 16). Keine Wirkung zeigte die Behandlung mit mAk JJ316 und JJ319 bei dieser Versuchsreihe auf den Verlauf des IgG2b-Serumtiters. Bei ähnlichen Ausgangswerten verliefen die Antikörperwerte fast parallel. Auffällig ist der hohe Ausgangswert eines der Tiere aus der Kontrollgruppe mit PBS und der Anstieg des IgG2b eines der Tiere aus dieser Gruppe an Tag 11 (Abb. 16).

Einen starken Anstieg durch die Behandlung mit mAk JJ316 zeigte der Serumtiter von IgM. Bei wiederum ausgeglichenen Anfangswerten stieg die Produktion am Tag fünf in der Behandlungsgruppe mit JJ316 steil an und fiel am Tag 12 wieder auf das Niveau der beiden anderen Gruppen (Abb. 17). Die Behandlung mit JJ319 hatte keinen Einfluß auf die IgM-Produktion und auch die Kontrollgruppe mit PBS blieb auf einem konstant niedrigen Niveau. Wie zu erwarten, lag der Anstieg der Serumkonzentration des Isotypen IgM vor den steigenden Werten bei IgG1 und IgG2a, die dann keinen Abfall, sondern eine längere Plateauphase zeigten.

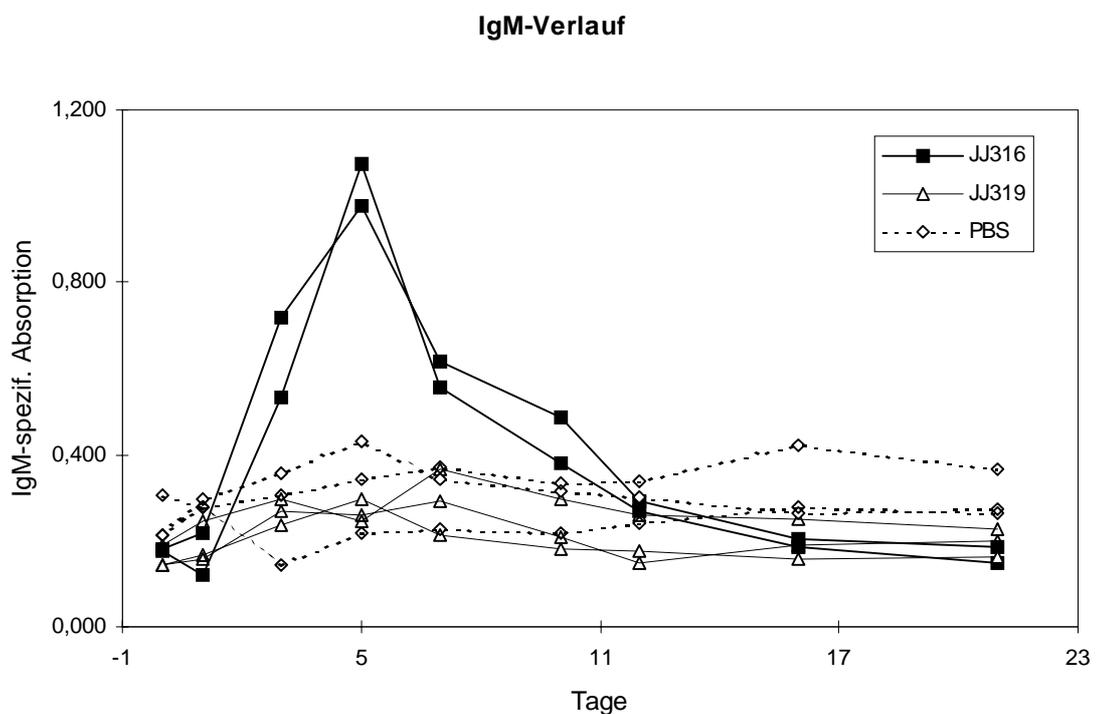


Abbildung 17: Verlauf des IgM-Titers bei erwachsenen LEW-Ratten nach Applikation von mAk JJ316 oder JJ319
 Erwachsenen LEW-Ratten wurde eine Einzeldosis von 2mg des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316, des konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Vor der Inokulation bzw. nach einem, drei, fünf, sieben, zehn, zwölf, sechzehn und einundzwanzig Tagen wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, das Serum gewonnen und ein IgM-spezifischer ELISA durchgeführt. Dargestellt ist der Verlauf der IgM-spezifischen Absorption zu verschiedenen Zeitpunkten für die Tiere behandelt mit JJ316 (■); JJ319 (△) und PBS (◇).

Von besonderem Interesse war auch bei diesem Versuch die Wirkung von mAk JJ316 auf den Th2-spezifischen Isotypen IgE, zeigten doch alle bisher durchgeführten Versuche einen deutlichen Anstieg dieses Antikörpers, der besonders für eine stärker Th2-gewichtete Aktivierung der Immunantwort spricht. Im Vergleich zu der Behandlungsgruppe mit dem konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 war die Antikörperproduktion durch Gabe des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 um mehr als das Zehnfache erhöht. Bei der Kontrollgruppe mit PBS konnte keinerlei IgE nachgewiesen werden. Es kam zwar ab Tag 7 zu einem Abfall der Serumkonzentration der Behandlungsgruppe mit JJ316, allerdings lag im gesamten Zeitraum die IgE-Serumkonzentration deutlich über den anderen Tieren (Abb. 18).

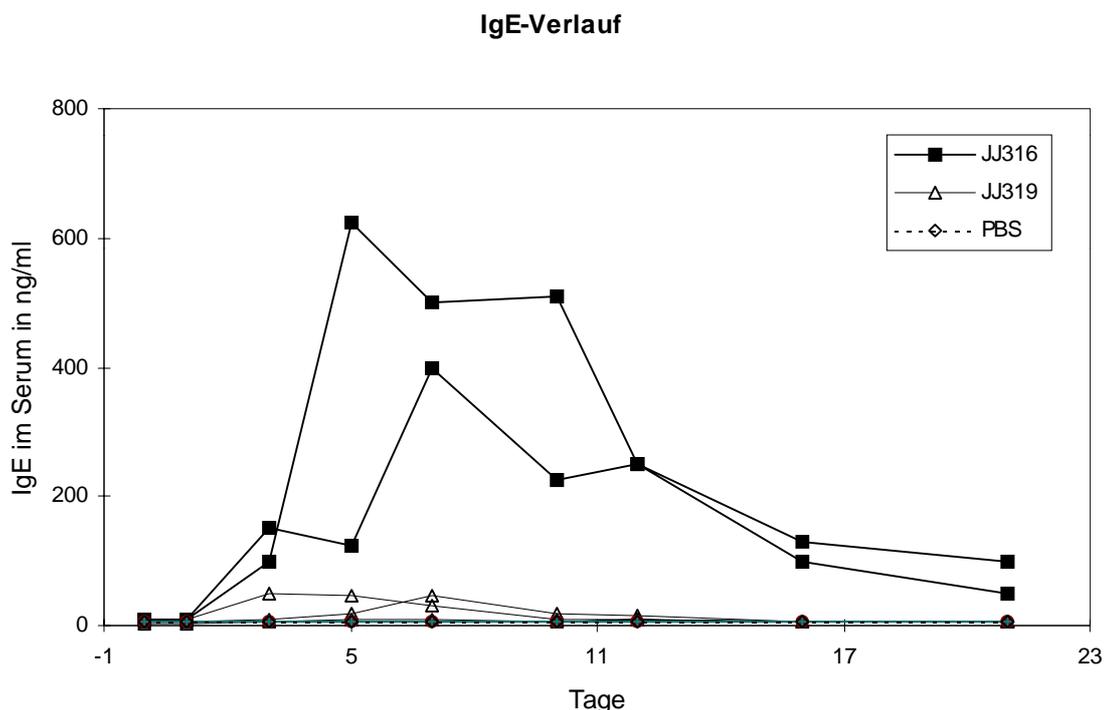


Abbildung 18: Verlauf des IgE-Titers bei erwachsenen LEW-Ratten nach Applikation von mAk JJ316 oder JJ319

Erwachsenen LEW-Ratten wurde eine Einzeldosis von 2mg des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316, des konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Vor der Inokulation bzw. nach einem, drei, fünf, sieben, zehn, zwölf, sechzehn und einundzwanzig Tagen wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, das Serum gewonnen und ein IgE-spezifischer ELISA durchgeführt. Dargestellt ist der Verlauf der IgE-Serumtiters zu verschiedenen Zeitpunkten für die Tiere behandelt mit JJ316 (■); JJ319 (Δ) und PBS (◇).

Die Untersuchung der Änderungen der Immunglobulinkonzentration nach Behandlung mit mAk JJ316 an individuellen Tieren bestätigte die Ergebnisse der vorherigen Versuche mit LEW-Ratten. Zwar war diesmal kein Einfluß im Sinne einer erniedrigten IgG2b-Konzentration nachweisbar (allerdings im Vergleich zur Kontrollgruppe mit PBS auch keinerlei Erhöhung) und auch der Verlauf des IgG2a-Titers zeigte keine großen Unterschiede, jedoch war bei IgG1 ein

starker Anstieg erkennbar und die Serumtiter verblieben auf einem hohen Plateau. Die verstärkte Produktion von IgM spricht für eine starke Aktivierung primärer B-Zellen ohne spezifische Verstärkung einer B-Zell-Antwort, allerdings zeigt auch hier die Gabe von mAk JJ316 eine deutliche Wirkung. Der typischerweise nach kürzerer Zeit abfallende IgM-Titer wurde bei diesen Tieren durch einen hohen - Th2-spezifischen - IgG1-Titer weitergeführt. Besonders deutlich ist die Induktion der Th2-Antwort durch den mitogenen mAk JJ316 bei IgE sichtbar - gab es bei den anderen Isotypen noch eine gewisse Produktion auch in der Behandlungsgruppe mit JJ319 und der Kontrollgruppe, kommt es fast ausschließlich in der mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 behandelten Gruppe zu einem Anstieg des IgE. Interessant ist das teilweise differierende Ansprechen der Tiere auf die gleiche Behandlung in einer Gruppe und die teilweise schon zu Beginn höheren Serumkonzentrationen von Immunglobulinisotypen bei manchen Tieren.

Insgesamt zeigte auch die Versuchsreihe an den LEW-Ratten, dass der mitogene mAk JJ316 auch bei den normalerweise Th1-prädisponierten Tieren zu einer Verstärkung der Th2-Immunantwort führt. Tabelle 4 fasst die wichtigsten Ergebnisse bei den LEW-Ratten stark vereinfacht zusammen.

	IgG1		IgG2a		IgG2b		IgE									
	JJ316	JJ319	JJ316	JJ319	JJ316	JJ319	JJ316	JJ319								
Jungtiere																
Behandlungsdauer																
1 Woche*									↑	↔	↑↑	↑	↑	↔	↔	↔
2 Wochen*									↑	↔	↑	↔	↔	↔	↑↑	↑
3 Wochen*									↑↑	↔	↑↑	↑	↑	↔	↑↑	↑
4 Wochen	↑	↔	↑	↔	↑	↔	↑↑**	↔								
Erwachsene Tiere (zusammen)	↑↑	↔	↑↑	↔	↑	↔	n.d.	n.d.								
Erwachsene Tiere (individual)	↑↑	↔	↑	↔	↓	↓	↑↑	↔								
Alte Tiere	↑	↔	↑↔	↔	↔	↔	↑↑	↔								

Tabelle 4: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse bzgl. des Einflusses von mAk JJ316 auf die Immunantwort von LEW-Ratten

Dargestellt ist in stark vereinfachter Weise die Wirkung der Gabe von mAk JJ316 bzw. JJ319 auf den Serumtiter bzw. die Frequenz immunglobulinproduzierender Zellen im Verhältnis zur Kontrollgruppe mit PBS. ↑↑= starker Anstieg; ↑=moderater Anstieg; ↔=keine Veränderung; ↓=Abfall

* Vergleich der Tiere miteinander und nicht mit einer PBS-Kontrollgruppe; ** starker Anstieg nur bei einem Tier; n.d.=nicht durchgeführt

Bei nicht-vorbehandelten Brown-Norway- und Lewis-Ratten konnte durch die Gabe des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 die Immunglobulinkonzentration im Serum erhöht und auch in die Richtung einer Th2-Reaktion gelenkt werden. Die unterschiedliche Ausgangslage der beiden Stämme - BN eher Th-2-, LEW eher Th-1-gewichtet - beeinflusste die Wirkung auf die Antikörperproduktion nicht ausschlaggebend, da in beiden Stämmen gezeigt wurde, daß eine Th2-Antwort durch Gabe von mAk JJ316 gefördert wird, eine Effekt, der mit dem konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 nicht erreichbar ist. Allerdings zeigten sich bei beiden Rattenstämmen Anzeichen, dass die Beeinflussung der B-Zell-Antwort in Richtung einer Th2-Antwort von mAk JJ316 mit steigendem Alter der Tiere abzunehmen scheint.

3.3. Untersuchung der Immunglobulinproduktion bei zuvor immunisierten Ratten

Nachdem in den vorausgegangenen Versuchen die Immunantwort bei jeweils vorher nicht behandelten Ratten untersucht wurde, wurde nun der Einfluß des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 auf Tiere getestet, deren Immunsystem zuvor mit einer Mischung aus Ovalbumin (OVA) - Alaun und Bordetella-Pertussis-Toxin aktiviert wurde. Den Tieren wurde diese Suspension i.p. appliziert und nach vier Wochen erhielten die Tiere mAk JJ316, JJ319 oder R73, lösliches OVA bzw. PBS i.p. gespritzt. Analog zu den bisherigen Abläufen wurden diese Untersuchungen an erwachsenen und alten BN- und LEW-Ratten durchgeführt, um möglicherweise unterschiedliche Reaktionen darstellen zu können. Da bei den bisherigen Versuchen ein Effekt der Antikörperbehandlung meist mit einem Anstieg der Immunglobulinwerte ab dem fünften Tag zu erkennen war, wurde bei diesen Versuchen die Immunantwort nur fünf Tage nach Applikation untersucht. Neben den *in vivo*- Tests wurde auch der Einfluss einer erneuten Stimulation mit löslichem OVA auf die Lymphknotenzellen der zuvor mit Antikörper behandelten Tiere *in vitro* mit Hilfe des Proliferationsassays nachgeprüft.

3.3.1. Einfluss der Antikörperbehandlung auf BN-Ratten nach Immunisierung

Bei immunisierten BN-Ratten zeigte die Behandlung mit mAk JJ316 oder JJ319 keine bemerkenswerte Wirkung. Im ELISA wichen die Serumtiter von IgG1, IgG2a und IgE nur sehr wenig von der Kontrollgruppe mit PBS ab (Daten nicht gezeigt). Nur eine leichte Steigerung der IgG2b-Produktion bei neun Wochen alten BN-Ratten (Daten nicht gezeigt) und eine etwas stärkere Steigerung der IgG2b-Produktion bei sieben Monate alten Brown-Norway-Ratten war erkennbar (Abbildung 18). Zugabe von löslichem OVA zu Lymphknotenzellen der vorbehandelten Tiere *in vitro* führte bei den neun Wochen alten BN-Ratten zu einer starken

Proliferationssteigerung der mit löslichem OVA gespritzten Tiere und zu einer leicht höheren Proliferationsrate der mit JJ316 behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt). Bei den sieben Monate alten BN-Ratten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Zellproliferation. Die Frequenz der OVA-spezifisch immunglobulinproduzierender Zellen im ELISPOT war in beiden Altersstufen nur sehr gering und zeigte keine nennenswerten Differenzen.

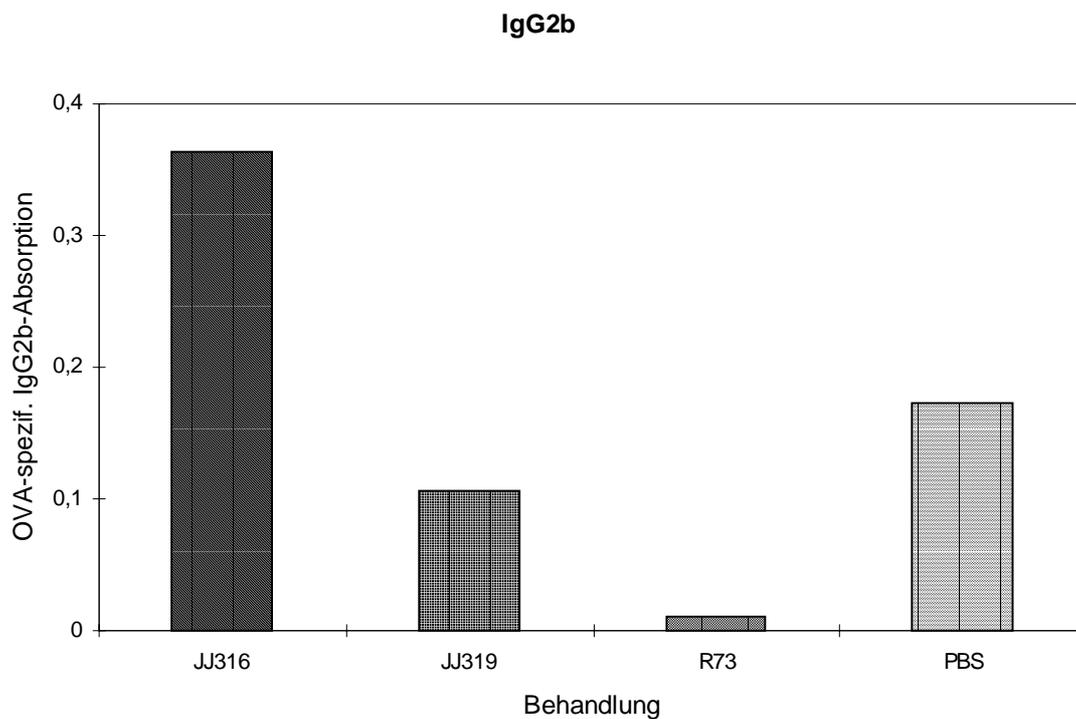


Abbildung 18: Ovalbuminspezifische IgG2b-Produktion bei zuvor mit OVA immunisierten sieben Monate alten BN-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316, JJ319 und R73

Sieben Monate alte BN-Ratten wurden mit Ovalbumin (10 µg OVA in 0,5 ml Alaun auf 1,5 ml PBS) u. 2×10^9 Bordetella-Pertussis-Toxin i.p. immunisiert. Vier Wochen nach Immunisierung wurde den Tieren jeweils 2 mg mAk JJ316, JJ319 oder R73, 200 µg löslichem Ovalbumin bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Fünf Tage nach Inokulation wurde die OVA-spezifische Immunantwort untersucht. Dargestellt ist das Verhältnis der IgG2b-Produktion in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die Werte entsprechen in der Gruppe mit mAk JJ316 und JJ319 je einem Tier, in den anderen Gruppen dem Mittelwert von je zwei Tieren.

3.3.2. Effekt der Antikörperbehandlung auf die antigenspezifische Immunreaktion bei immunisierten LEW-Ratten

Bei der Behandlung von drei Monate alten LEW-Ratten, die zuvor mit OVA-Alaun-Pertussistoxin immunisiert wurden, zeigte die Applikation des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 im Vergleich zum konventionellen mAk JJ319 im nicht-OVA-spezifischen ELISPOT einen Anstieg der Frequenz der IgG1- und IgG2a-produzierenden Zellen in der Behandlungsgruppe mit JJ316 und bestätigte somit die bisherigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Im Serum der Tiere zeigten sich Unterschiede in der Konzentration OVA-spezifischer Immunglobuline. Im ELISA zeigte sich eine höhere Serumkonzentration für IgG1 nach Behandlung mit dem mAk JJ316 (Abb. 20). Im Vergleich zur Behandlungsgruppe mit dem konventionellen mAk JJ319 zeigte die Gabe von mitogenem mAk JJ316 eine verringerte IgG2b-Produktion (Abb. 20). Auf die Frequenz OVA-spezifischer Immunglobulinproduzierender Zellen hatte die Behandlung keinen erkennbaren Einfluß (Daten nicht gezeigt).

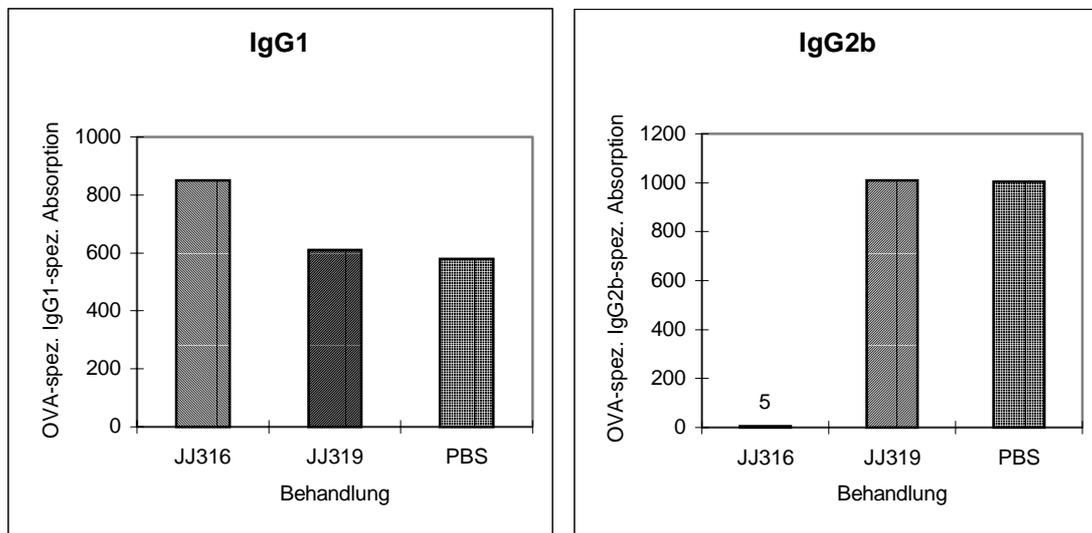


Abbildung 20: Ovalbuminspezifische IgG1- und IgG2b-Produktion bei zuvor mit OVA immunisierten drei Monate alten LEW-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316 und JJ319

Drei Monate alte LEW-Ratten wurden mit Ovalbumin ($10\mu\text{g}$ OVA in $0,5\text{ml}$ Alaun auf $1,5\text{ml}$ PBS) u. 2×10^9 Bordetella-Pertussis-Toxin i.p. immunisiert. Dreieinhalb Wochen nach Immunisierung wurde den Tieren je 2mg mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Fünf Tage nach Inokulation wurde die OVA-spezifische Immunantwort untersucht. Dargestellt ist die OVA-spezifische IgG1-spezifische Absorption (links) bzw. die IgG2b-spezifische Absorption (rechts).

Erkennbare Unterschiede der OVA-spezifischen Immunantwort zeigte die Behandlung mit mAk JJ316 bei sieben Monate alten LEW-Ratten. Im ELISA zeigt sich, dass sowohl der IgG2a- als

auch der IgG2b-Serumtiter durch die Gabe des mitogenen mAk JJ316 im Vergleich zum konventionellen mAk JJ319 und der Kontrollgruppe mit PBS deutlich ansteigt (Abb. 21). Bei den Isotypen IgG1 und IgE zeigte sich nur eine geringe Produktion und wenig Unterschiede zwischen den Tieren (Daten nicht gezeigt).

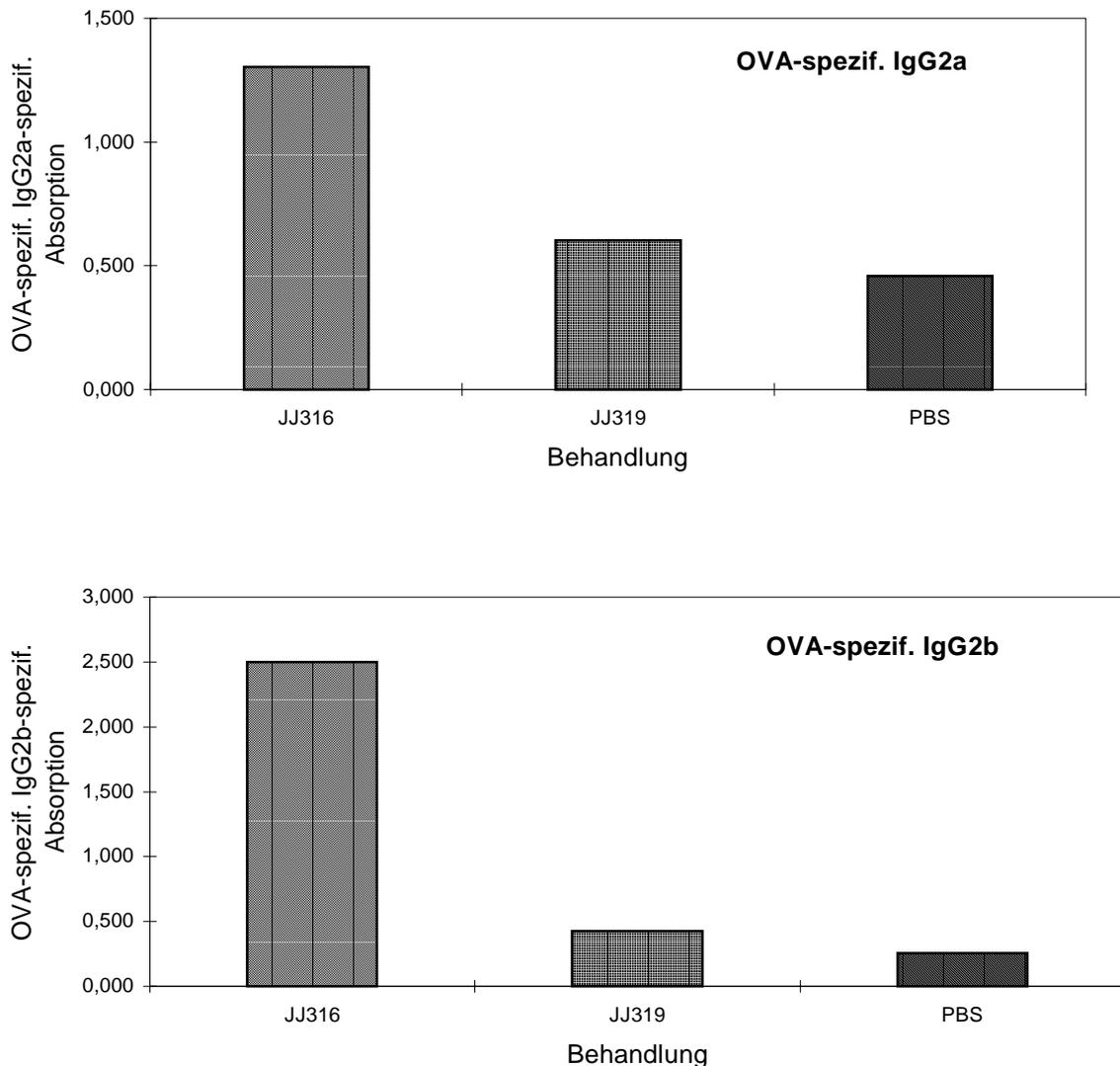


Abbildung 21: Ovalbuminspezifische IgG2a- und IgG2b-Produktion bei zuvor mit OVA immunisierten sieben Monate alten LEW-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316 und JJ319

Sieben Monate alte LEW-Ratten wurden mit Ovalbumin ($10 \mu\text{g}$ OVA in $0,5 \text{ ml}$ Alaun auf $1,5 \text{ ml}$ PBS) u. 2×10^9 Bordetella-Pertussis-Toxin i.p. immunisiert. Dreieinhalb Wochen nach Immunisierung wurde den Tieren je 2 mg mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Fünf Tage nach Inokulation wurde die OVA-spezifische Immunantwort untersucht. Dargestellt ist das Verhältnis der Antikörperproduktion als Einzelwert der Behandlung mit mAk JJ316 und als Mittelwert von je zwei Tieren bei mAk JJ319 und PBS für IgG2a (oben) IgG2b (unten).

Unterschiede in der Frequenz der OVA-spezifisch Immunglobuline produzierender Zellen konnten im ELISPOT vor allem für IgG2a nachgewiesen werden (Abbildung 22). Die Applikation

von mitogenem CD28-spezifischen mAk JJ316 führte zu einer deutlichen Steigerung nach fünf Tagen im Vergleich zum konventionellen mAk JJ319, der auf Höhe der Kontrollgruppe verblieb. Bei IgG1 war - ähnlich zum Serumlevel - auch die Frequenz der produzierenden Zellen fast gleich. IgG2b wurde nach Behandlung mit JJ316 und löslichem OVA am meisten gebildet, jedoch waren die Gesamtmengen von IgG1, IgG2b und vor allem IgE sehr gering (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigt mAk JJ316 bei zuvor immunisierten Tieren einen stärkeren Einfluß bei alten Tieren, wohingegen bei den zuvor durchgeführten Versuchsreihen mit nicht vorbehandelten Ratten, die Immunglobulinproduktion bei jüngeren Tieren stärker erhöht wurde.

OVA-spezifisches IgG2a

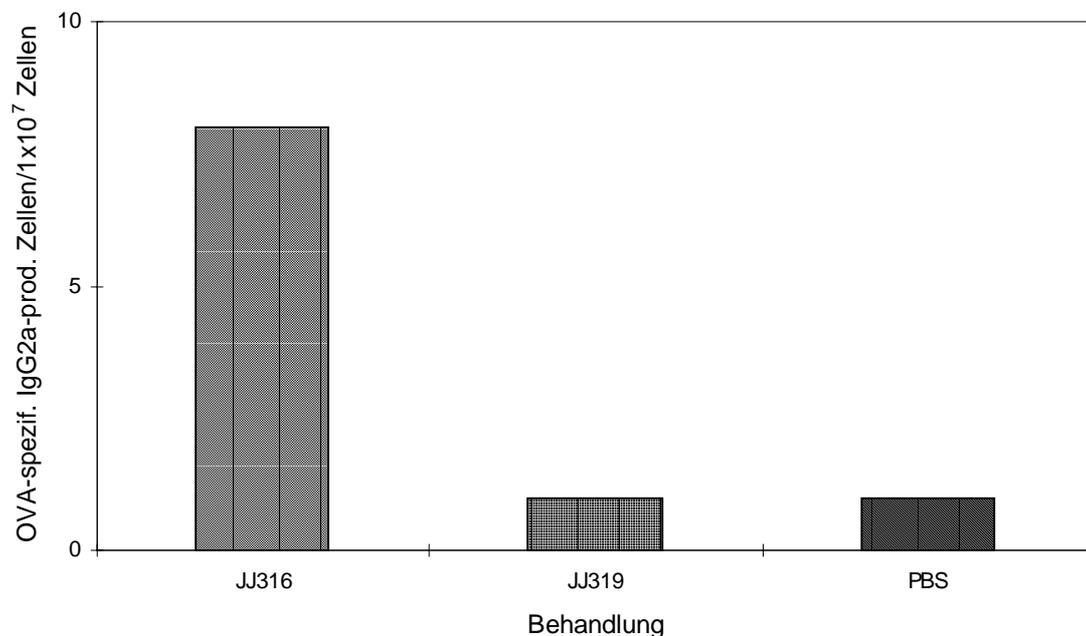


Abbildung 22: Frequenz der ovalbuminspezifisches IgG2a-produzierenden Zellen bei zuvor mit OVA immunisierten sieben Monate alten LEW-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316 und JJ319

Sieben Monate alte LEW-Ratten wurden mit Ovalbumin ($10 \mu\text{g}$ OVA in $0,5 \text{ ml}$ Alaun auf $1,5 \text{ ml}$ PBS) u. 2×10^9 Bordetella-Pertussis-Toxin i.p. immunisiert. Dreieinhalb Wochen nach Immunisierung wurde den Tieren je 2 mg mAk JJ316 oder JJ319 bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Fünf Tagen nach Applikation wurde die OVA-spezifische Immunantwort mit einem Elispot-Assay untersucht. Dargestellt ist die Frequenz der Zellen, die ovalbuminspezifisches IgG2a produzierten, wobei der Einzelwert der Behandlung mit mAk JJ316 und die Mittelwerte von je zwei Tieren bei mAk JJ319 und PBS aufgetragen wurden.

3.3.3. Einfluß der Behandlung mit mAk JJ316 auf die Zellproliferation immunisierter Tiere

Zur weiteren Untersuchung der Wirkung von JJ316 auf die Immunantwort der Tiere wurde den zuvor mit OVA-Alaun-Pertussistoxin immunisierten Tieren nach vier Wochen mAk JJ316, JJ319 oder R73, lösliches OVA bzw. PBS in gleicher Menge i.p. appliziert. Nach fünf Tagen wurden mesenteriale und zervikale Lymphknoten entnommen und ungetrennte Lymphknotenzellen mit oder ohne Zugabe von löslichem OVA in Kultur genommen. Nach vier Tagen wurde die Zellproliferation durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin untersucht. **Ohne** Zugabe von löslichem OVA kam es *in vitro* zu keinen größeren Abweichungen in der Zellproliferation zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Tieren. **Mit** Zugabe von löslichem OVA kam es jedoch zu einer deutlichen Steigerung der Proliferationsrate der Lymphknotenzellen des zuvor mit mitogenem CD28-spezifischen mAk JJ316 behandelten Tieres. Einen positiven Effekt erkennt man auch durch die Applikation von R73 und OVA, wohingegen die Behandlung mit dem konventionellen mAk JJ319 *in vitro* zu keiner Veränderung der Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe mit PBS führt (Abb. 23).

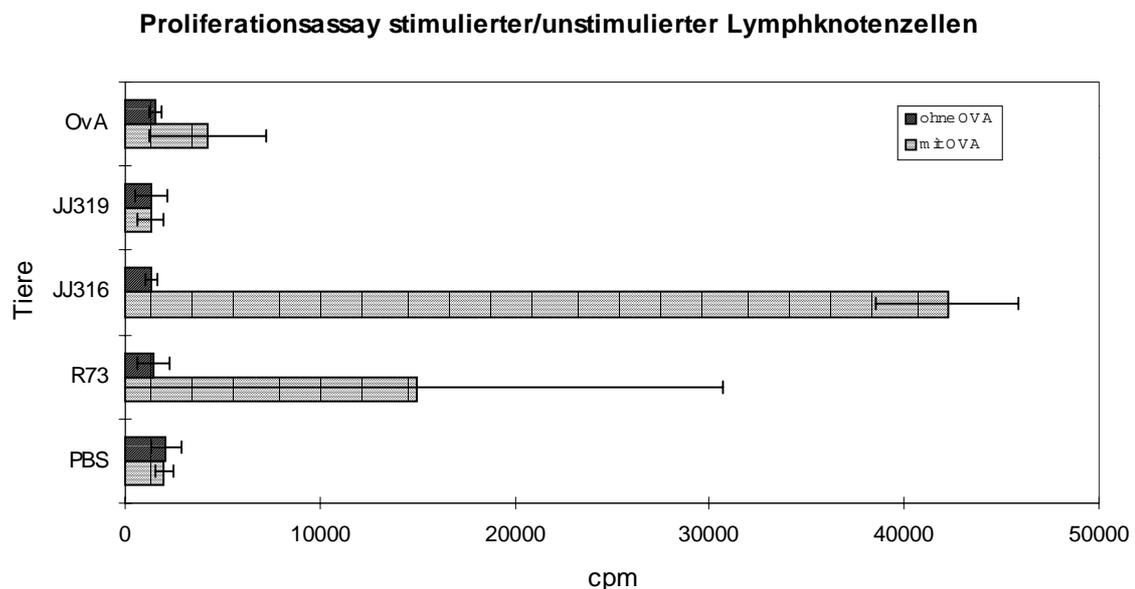


Abbildung 23: Proliferationsassay von stimulierten und unstimulierten Lymphknotenzellen von zuvor mit OVA immunisierten sieben Monate alten LEW-Ratten nach Behandlung mit mAk JJ316, JJ319, R73 bzw. löslichem OVA

Sieben Monate alte LEW-Ratten wurden mit Ovalbumin ($10 \mu\text{g}$ OVA in $0,5 \text{ ml}$ Alaun auf $1,5 \text{ ml}$ PBS) u. 2×10^9 Bordetella-Pertussis-Toxin i.p. immunisiert. Dreieinhalb Wochen nach Immunisierung wurde den Tieren je 2 mg mAk JJ316, JJ319 oder R73 bzw. $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ lösliches OVA bzw. PBS in gleicher Menge i.p. gespritzt. Fünf Tagen nach Applikation wurden die Tiere getötet, die Lymphknoten entnommen und je 5×10^6 Lymphknotenzellen entweder ohne oder mit $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ löslichem Ovalbumin in RPMI⁺ in Kultur genommen. Vom dritten auf den vierten Tag wurden die Zellen mit $25 \mu\text{l}$ ^3H -Thymidin für 21 Stunden gepulst und anschließend geerntet. Dargestellt ist das Proliferationsassay der stimulierten (mit OVA) und unstimulierten (ohne OVA) Lymphknotenzellen. Der Wert für JJ316 ist ein Einzelwert, wohingegen die restlichen Werte je dem Mittelwert zweier Tiere entsprechen.

Die Gabe von mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 an Tiere, deren Immunsystem zuvor schon durch Applikation von OVA-Alaun-Pertussistoxin stimuliert wurde, führte mit diesem

Versuchsaufbau vor allem bei LEW-Ratten zu stärkeren Unterschieden in der Immunantwort. Besonders deutlich ist der Effekt bei älteren Tieren, wohingegen bei jüngeren LEW-Ratten nur eine geringe Wirkung sichtbar wurde. Bei BN-Ratten ist in beiden Altersgruppen nur wenig Einfluss auf die Immunantwort deutlich geworden. Anders als bei den nicht immunisierten Tieren können bei beiden Stämmen durch die Antikörpergabe auch erhöhte IgG2b-Werte nachgewiesen werden, dem Th1-spezifischen Immunglobulin. Möglicherweise führt bei mit OVA vorbehandelten Tieren die JJ316-Applikation eher zu einer generalisiert verstärkten Immunantwort und nicht zu einer spezifisch Th2-gewichteten Reaktion, wie es bei den nicht immunisierten Tieren möglich ist.

4. Diskussion

Die Aktivierung von T-Zellen benötigt neben einem Signal über den TZR ein co-stimulatorisches Signal, da die T-Zelle in Abwesenheit dieser Co-Stimulation anergisch wird. Die Interaktion des Oberflächenmoleküls CD28 auf T-Zellen mit CD80 bzw. CD86 auf APZ wurde in der Vergangenheit als einer der wichtigsten Aspekte dieser Co-Stimulation beschrieben. Bei Untersuchungen mit den CD28-spezifischen mAk JJ316 und JJ319 in der Ratte konnte gezeigt werden, dass neben der herkömmlichen Co-Stimulation auch eine direkte Stimulation von ruhenden T-Zellen möglich ist. JJ316 und JJ319 sind Antikörper des gleichen Isotyps und haben identische co-stimulatorische Potenz mit einem Optimum in ng/ml - Bereich. Bei einer 100fach höheren Konzentration kann der mitogene mAk JJ316 in Abwesenheit eines TZR-Signals ruhende T-Zellen direkt stimulieren, was zu einer deutlichen Lymphozytose vor allem von CD4⁺, aber auch in geringeren Umfang von CD8⁺-T-Zellen führt [Tacke et al., 1997]. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass CD28 - in Abhängigkeit von der Stärke des TZR-Signals [Tao et al., 1997] - eine wichtige Rolle in der Differenzierung zwischen einer Th1- und Th2-Immunantwort spielt [Tao et al., 1997; Rulifson et al., 1997; Hanke, 1997]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 durch direkte Stimulation *in vivo* auf die Immunantwort untersucht. Der konventionelle CD28-spezifische mAk JJ319 diente als Kontrolle für die CD28-Ligation ohne TZR-unabhängige Aktivierung.

Die Gabe des mitogenen mAk JJ316 *in vivo* führte in BN-Ratten, einem Stamm der häufiger mit einer Th2-Antwort reagiert, zu einer verstärkten Th2-Antwort, deutlich erkennbar an einem Anstieg der Th2-spezifischen Immunglobuline IgE und IgG2a bei ab der Geburt behandelten BN-Ratten, einer höheren Produktion von IgE, IgG1 und IgG2a bei neun Wochen alten Tieren und erhöhten Konzentrationen von IgE und IgG2a bei sieben Monate alten BN-Ratten im Vergleich zu einer Behandlung mit dem konventionellen mAk JJ319. Bei Untersuchung der Immunglobulinproduktion *in vitro* zeigte der Zusatz von mitogenem CD28-spezifischen mAk JJ316 einen Anstieg aller Isotypen, auch des Th1-spezifischen IgG2b. Möglicherweise führt JJ316 *in vitro* eher zu einer unspezifischen Aktivierung der T-Zellen und somit indirekt auch der B-Zellen und benötigt noch zusätzliche, *in vivo* vorliegende, Faktoren oder bei BN-Ratten führt der mitogene CD28-spezifische mAk JJ316 nicht zu einem anhand der Immunglobulinsubtypen sichtbaren Wechsel der B-Zell-Antwort, sondern nur zu einem - evtl. verstärkten - Abruf des vorliegenden Potentials dieser Tiere.

Auch in den stärker Th1-gewichtet reagierenden LEW-Ratten konnte ein deutlicher Anstieg von Th2-typischen Immunglobulinen nachgewiesen werden. Bei Jungtieren, die ab der Geburt behandelt wurden, zeigten zwei getrennte Experimente eine erhöhte Produktion von IgG1, IgG2a und IgE, bei teilweiser Unterdrückung des Th1-spezifischen IgG2b. Auch bei drei Monate

alten LEW-Ratten konnte in mehreren Versuchen ein Steigerung der Th2-Immunantwort nachgewiesen werden, erkennbar an einem erneut erhöhten Serumlevel von IgG1, IgG2a und IgE. Vor allem der Effekt auf die Produktion von IgE war auffallend, da die Behandlung mit mitogenem mAk JJ316 zu einer über 20fach höheren Konzentration des Th2-spezifischen Immunglobulins im Vergleich zum konventionellen mAk JJ319 führte. Bei sieben Monate alten LEW-Ratten bestanden evtl. aufgrund früherer Antigenerfahrungen ausgeglichene Konzentrationen der Immunglobuline, wobei erneut eine stark erhöhte Produktion von IgE gezeigt werden konnte.

Untersuchungen an zuvor mit OVA-Pertussis immunisierten Ratten beider Stämme zeigten teilweise ähnliche Ergebnisse wie unbehandelte Tiere. Bemerkenswert ist die große Steigerung der Proliferationsrate *in vitro* von LEW-Ratten, behandelt mit mitogenem CD28-spezifischen mAk JJ316 nach Zusatz von löslichem OVA zur Kultur.

Die Anwesenheit von IL-4 ist ein Wachstumsfaktor für B-Zellen und führt zu einem Klassenswitch von IgM zu IgG1 und IgE, den typischen Immunglobulinen einer Th2-Immunantwort [Mosmann et al., 1989]. IL-4 ^{-/-} Mäuse haben nur einen verringerten IgG1-Level [Kühn et al., 1991] und kein nachweisbares IgE im Serum [Kopf et al., 1993]. Aus diesen Gründen ist IL-4 ein wichtiger Marker für die Wirkung des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 für die Differenzierung der Th1/Th2-Immunantwort auf der Ebene der Zytokine. Bei den untersuchten Tieren wurden parallel zu den obigen Versuchen von M. Rodriguez-Palmero intrazelluläre Zytokinassays durchgeführt und in RNase-Protektion-Assays die mRNA der Tiere untersucht [Rodriguez-Palmero et al., 1999]. Die hierbei gefundenen Ergebnisse können die Verstärkung der Th2-Immunantwort durch Behandlung mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 bestätigen. Bei LEW-Jungtieren (Behandlung ab einer Woche nach der Geburt) konnte ein Anstieg der Th2-spezifischen IL-4mRNA und noch deutlicher der IL-10mRNA nachgewiesen werden. Bei der *ex-vivo*-intrazellulären Zytokinfärbung von Milzzellen dieser Tiere waren nach vier Tagen in der Durchflusszytometrie 6% der CD4⁺-Blasten der mit mAk JJ316 behandelten Tiere IL-4 positiv, wohingegen in den anderen Behandlungsgruppen nur Hintergrundfärbungen nachweisbar waren. Die deutliche Steigerung der Th2-spezifischen Immunglobuline IgG1, IgG2a und vor allem IgE durch Behandlung mit mitogenem CD28-spezifischen mAk JJ316 im Vergleich zum konventionellen mAk JJ319 könnte durch die erhöhte Produktion von IL-4 initiiert werden. In den *ex vivo*-Untersuchungen bei drei Monate alten LEW-Ratten fand sich eine geringere Induktion Th2-spezifischer Zytokine. Zwar konnte mit Hilfe des RNase-Protektion-Assays erneut IL-10mRNA in den mit mitogenem mAk JJ316 behandelten Tieren gezeigt werden, jedoch war in der Durchflusszytometrie kein Anstieg von IL-4 und im RNase-Protektion-Assay keine IL-4-mRNA nachweisbar. Die Bereitschaft der normalerweise stärker Th1-reagierenden LEW-Ratten zu einer vermehrten Produktion Th2-spezifischer Immunglobuline und Zytokine scheint im Alter abzunehmen, was auch in oben gezeigten

Versuchen mit sieben Monate alten LEW-Ratten bestätigt wurde, wo nur noch der Isotyp IgE einen Anstieg zeigte und die anderen Immunglobulinsubtypen nur geringe Veränderungen in den Serumkonzentrationen zeigten.

Neben dem IL-4 vermittelten Effekt gibt es aber auch Hinweise, dass CD28 auf einem teilweise IL-4-unabhängigen Weg zur Th2-Immunantwort führt. Bei einem kleinen Teil der humanen CD4⁺CD45RA⁺R0⁻ T-Zellen führt in einem ersten Schritt die Gabe von CD28-spezifischen mAk zusammen mit IL-2 unabhängig von einem TZR/CD3-Signal in Abwesenheit von IL-4 zur Proliferation der Zellen und Differenzierung zu Th2-Vorläuferzellen. Kommt es zu einer erneuten Stimulation mit CD3- und CD28 spezifischen Antikörpern produzieren diese Zellen verstärkt Th2-spezifische Zytokine und induzieren in einem zweiten Schritt - evtl. ähnlich wie die murinen CD4+NK1.1-Zellen - die Th2-Differenzierung anderer Zellen, dann allerdings über eine IL-4-Ausschüttung [Brinkmann et al., 1996].

Hinsichtlich des Mechanismus der CD28-induzierten Th2-Differenzierung zeigten *in vitro*-Untersuchungen, dass direkte Stimulation mit mitogenem CD28-spezifischen mAk JJ316 einen „Priming“-Effekt für Th2-Differenzierung bewirkt, allerdings IL-4-Produktion in LEW CD4-T-Zellkulturen nur durch Zugabe von exogenem IL-4 herbeigeführt werden kann, wohingegen im „Th2-Stamm“ BN kein exogenes IL-4 für eine IL-4-Produktion benötigt wird [Rodriguez-Palmero et al., 1999]. Die in obigen Versuchen nachgewiesene Th2-Differenzierung in beiden Stämmen *in vivo* scheint demnach vor allem vom Vorhandensein von endogenem IL-4 in den Tieren abzuhängen. Im Gegensatz zur „direkten“ CD28-Stimulation mit mitogenem mAk JJ316 hatte die Co-Stimulation mit dem konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 nur einen sehr schwachen „Priming“-Effekt für die IL-4-abhängige Th2-Differenzierung.

Einen wichtigen Einfluss auf die Differenzierung der T-Helfer-Untergruppen scheint demnach die Stärke des TZR-Signals zu haben, welches bei direkter Stimulation über mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 im Vergleich zur Co-Stimulation fehlt. Andere Arbeitsgruppen konnten *in vivo* [Pfeiffer et al., 1991 und 1994] und *in vitro* [Constant et al., 1995 und 1997; Tao et al., 1997] diesen Zusammenhang bereits zeigen. Je stärker das Signal über den TZR ist, desto geringer wird die Bedeutung einer Co-Stimulation über CD28 für die Qualität der Immunantwort, wohingegen bei einer schwachen Aktivierung über den TZR der CD28-abhängige positive Einfluss auf die Th2-Differenzierung verstärkt wird. Bei einem starken TZR-Signal findet auch bei starker Co-Stimulation über CD28 keine Th2-Differenzierung statt [Tao et al., 1997]. Möglicherweise löst die in dieser Arbeit vor allem untersuchte direkte Stimulation mit dem mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316, bei der ein TZR-Signal fehlt, auf diesem Weg die Th2-spezifische Aktivierung der B-Zell-Antwort aus.

Die Differenzierung zwischen Th1 und Th2 wird durch die Bindung von CD28 an B7-1 (CD80) bzw. B7-2 (CD86) unterschiedlich beeinflusst. Wird die Produktion von IL-2, IL-2-Rezeptor- α - und γ -Ketten, sowie IFN- γ über beide Liganden noch gleich stark angeregt, wird nur durch Aktivierung über CD86 verstärkt IL-4 produziert, v. a. von naiven T-Zellen [Kuchroo et al., 1993]. Bei repetitiver Co-Stimulation von CD4⁺CD45RA⁺-Zellen mit B7-2 ergeben sich etwa gleiche Konzentrationen von IL-2 und IL-4, wohingegen bei wiederholter Stimulation mit B7-1 hohe IL-2-Mengen bei gleichzeitig niedrigen IL-4-Mengen messbar sind [Freeman et al., 1995]. Bei Untersuchungen der Experimentellen Allergischen Enzephalitis (EAE), einer Erkrankung, die durch autoreaktive Th1-Zellen erzeugt werden kann [Kuchroo et al., 1993], führte die Behandlung mit hemmenden anti-CD80-Antikörpern zu einer stärkeren Induktion der Th2-Antwort bei gleichzeitig abgeschwächter Th1-Antwort, was die Inzidenz und die Schwere der Erkrankung senkte, ein Effekt, welcher durch gleichzeitige Verhinderung einer IL-4-Ausschüttung revidiert wurde. Andererseits führte die Gabe von hemmenden anti-CD86-Antikörpern durch eine Verstärkung der Th1-Antwort zu einer höheren Krankheitszahl bei den Tieren. Die Behandlung mit den Antikörpern zeigte bei den Tieren keine generelle Beeinträchtigung ihres Immunsystems [Kuchroo et al., 1995]. Möglicherweise ähnelt die Bindung des mitogenen mAk JJ316 an CD28 der Ratte der Interaktion von CD86 (B7-2) mit dem co-stimulatorischen Oberflächenmolekül und kann deshalb ebenfalls eine verstärkte Th2-Immunantwort induzieren, wobei einschränkend zu sagen gilt, dass andere Arbeitsgruppen B7-1 bzw. B7-2 keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Zelldifferenzierung nachweisen konnten [Lanier et al., 1995; Natesan et al., 1996].

Der Einfluss des CD28-CD80/86-Systems auf die Th1/Th2-Immunantwort ist für viele Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen von entscheidender Bedeutung. Möglicherweise kann durch ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge ein Eingriff in dieses System, z. B. über Antikörper analog zum mAk JJ316 erfolgen. Allerdings gibt es auch sehr interessante Beispiele, bei der gerade der umgekehrte Effekt erwünscht wäre. So zeigten *in vitro* Versuche, dass durch Unterstützung der Th1-Immunantwort durch Gabe von IFN- γ eine Infektion mit *Leishmania donovani* durch Aktivierung Makrophagen zu einer schneller Abtötung des Erregers führt, wohingegen dieser Effekt durch Th2-spezifische Zytokine, IL-4 und IL-10, blockierbar ist [Liew et al., 1989]. Analog hierzu sind Beobachtungen *in vivo*, dass C57BL/6-Mäuse, welche bei einer Leishmanieninfektion IFN- γ produzieren und somit eine stärkere Th1-Antwort zeigen geringere Krankheitszeichen aufweisen, im Gegensatz zu BALB/c-Mäusen, welche bei Infektion mit *Leishmania donovani* verstärkt IL-4 bilden [Sadick et al., 1990]. Unterbrechung der CD28-Co-Stimulation durch lösliches CTLA-4-Ig konnte die in BALB/c-Mäusen die Produktion von IL-4 verringern und die Überlebensrate deutlich steigern [Corry et al., 1994].

Die Differenzierung des Immunsystems in Richtung Th1 bzw. Th2 spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, bei denen häufig eine zu starke Th1-Immunantwort vorliegt, z. B. führt das Fehlen von IL-10 in IL-10 ^{-/-} Mäusen zu schweren entzündlichen Darmerkrankungen, da evtl. schon auf eine normale Antigen-Stimulation eine zu starke Th1-Antwort ausgelöst wird [Kühn et al., 1993]. Eingriffe in dieses System können Autoimmunerkrankungen positiv beeinflussen, z. B. hat IL-4 bei der Experimentellen Allergischen Enzephalitis (EAE) einen protektiven Einfluss [Kuchroo et al., 1995]. Interessante Einblicke ergeben Versuche mit NOD-Mäuse (nonobese diabetic mice), welche zu einem Großteil im Laufe ihres Lebens eine schwere Insulitis im Pankreas und als Folge einen Diabetes Typ I (IDDM = insulin dependent diabetes mellitus) entwickeln. Behandlung von neonatalen NOD-Mäusen mit einem konventionellen CD28-spezifischen mAk in den ersten Lebenswochen verhindert die Entwicklung einer Insulitis und eines IDDM auf einem IL-4-abhängigen Weg [Arreaza et al., 1997]. CD28^{-/-} NOD-Mäuse erkranken um einiges häufiger an IDDM als CD28^{+/+} Kontrolltiere. Möglicherweise kontrolliert der CD28-Signalweg einen bzw. mehrere Faktor(en), mit dem der Ausbruch der Erkrankung zu verhindern ist [Lenschow et al., 1996]. Vielleicht könnte ein Eingriff in die Stimulation über CD28 in der Zukunft als Prävention gegen den Ausbruch von Diabetes Typ I genutzt werden [Cameron et al., 1998].

Sehr wahrscheinlich wird eine erfolgreiche Behandlung von Autoimmunerkrankungen erst durch Kombination von Antikörpern gegen verschiedene co-stimulatorische Epitope möglich sein, so führt z. B. erst die Gabe von CTLA-4-Ig (Behinderung der B7-CD28-Stimulation) zusammen mit einer Behandlung mit Antikörpern gegen gp39 (Blockade der CD40-gp39-Interaktion) zu deutlich höheren Heilungsraten bei Mäusen mit murinem Lupus [Daikh et al., 1997].

Besonders interessant auch im Hinblick auf eventuelle spätere Therapiemöglichkeiten sind natürlich Erkenntnisse mit humanen T-Zellen bzw. klinische Erkenntnisse. Auch humane Gedächtniszellen produzieren nach Prägung mit CD28-spezifischen Antikörpern bei erneuter Stimulation mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern verstärkt IL-4 [Schulze-Koops et al., 1998]. Durch Verwendung unterschiedlicher CD3-spezifischer Antikörper - OKT 3 (schwache Stimulation über CD3) und 64.1 (starke Stimulation über CD3) [Geppert et al., 1987] - und Anwendung in verschiedenen Konzentrationen konnte auch hier gezeigt werden, dass ein stärkeres TZR-Signal durch eine Steigerung des IFN- γ und eine Verminderung des IL-4 zu einer stärkeren Th1-Differenzierung führt, eine Bestätigung der bereits oben beschriebenen Ergebnisse [Tao et al., 1997] und auch der Erkenntnisse der *in vitro*-Versuche mit den in dieser Arbeit behandelten Ratten. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis - die durch eine überschießende Th1-Immunreaktion geprägt ist - wurde eine Behandlung mit einem humanisierten anti-CD4mAK (Orthoclone OKT cdr 4a) durchgeführt. Da durch diesen Antikörper das CD4-untersützte Signal über den TZR verringert wird, kommt es zu einer Dominanz des CD28-Signalweges. Durch die Therapie konnte eine zeitweilige Verbesserung der klinischen

Zeichen und ein signifikanter Abfall des Entzündungsparameters CRP erreicht werden, wobei die Anzahl der zirkulierenden CD4-T-Zellen konstant war und nach einigen Wochen eine Reduktion des IL-2 und der IFN- γ -mRNA bei den behandelten Patienten nachweisbar war [Schulze-Koops et al., 1998].

Die bisherigen Immuntherapien im Tierversuch z. B. bei muriner EAE, mit anti-CD4-Antikörpern, anti-MHC-II-Antikörpern oder anti-TZR-Antikörpern führte immer zu einer allgemeinen Blockierung der CD4⁺-T-Zellen, ähnlich wie die Behandlung mit Cyclosporin A oder FK506 in der humanen Transplantationsmedizin. Der Eingriff in das Immunsystem birgt neben dem sicherlich vorhandenen lebensverlängernden Nutzen für den Patienten auch einiges Risiko. Vielleicht kann in Zukunft durch Eingriffe in die Zellaktivierung eine differenzierte Beeinflussung der Immunantwort erfolgen und somit Transplantatabstossungen und Autoimmunerkrankungen ähnlich wie im Tierversuch [Lenschow et al., 1992; Finck et al., 1994] verhindert oder die Immunantwort gegen bestimmte Erreger verbessert werden. Selbstverständlich wäre auch die Behandlung mit mitogenem CD28-Antikörpern - wie z. B. der hier untersuchte mAk JJ316 im Rattenmodell - ein starker Eingriff in das Immunsystem und immer noch ein recht unspezifischer Ansatzpunkt. Allerdings führt ein derartige Behandlung nicht zu einer Blockade des Immunsystems, sondern zu einer Aktivierung der körpereigenen Abwehr. Bei immundefizienten Patienten könnte dieses System zur T-Zell-Vermehrung genutzt werden. Da die Produktion antiinflammatorischer Zytokine gefördert wird, wäre eine derartige Therapie mit hoher Wahrscheinlichkeit ungefährlicher als bisherige Ansätze.

5. Zusammenfassung

Zusätzlich zur Bindung eines MHCII-Antigen-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor ist ein co-stimulatorisches Signal erforderlich, um eine ruhende T-Zelle zu aktivieren. Einer der wichtigsten co-stimulatorischen Rezeptoren auf T-Zellen ist CD28, das über Bindung mit seinen auf antigenpräsentierenden Zellen exprimierten Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) Produktion und Proliferation der Zelle induziert. In Abhängigkeit vom TZR-Signal nimmt CD28 Einfluss auf die Th1/Th2-Differenzierung der Immunantwort. Bei einem schwachen TZR-Signal führt die Interaktion zwischen CD28 und seinen Liganden *in vitro* und *in vivo* durch Erhöhung spezifischer Cytokine (v. a. IL-4) zu einer Verstärkung der humoralen Th2-Antwort bei einer gleichzeitigen Unterdrückung der inflammatorischen Th1-Antwort. Die rattenspezifischen monoklonalen Antikörper JJ316 und JJ319 binden an das CD28-Molekül und haben beide ein gleichstarkes co-stimulatorisches Potential. Gabe des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 - und nicht des konventionellen mAk JJ319 - führt auch ohne TZR-Signal *in vitro* zu Produktion und Proliferation der Zellen (Direkte Stimulation). *In vivo* führt Gabe von JJ316 zu einer Erhöhung der Zellzahl in Milz und Lymphknoten mit einem Maximum nach drei Tagen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe des mitogenen CD28-spezifischen mAk JJ316 im Vergleich mit dem konventionellen CD28-spezifischen mAk JJ319 auch *in vivo* zu einer Erhöhung der Th2-spezifischen Immunglobuline führt. Bei Brown-Norway-Ratten, die generell verstärkt mit einer humoralen Immunantwort reagieren, zeigte die Behandlung von Jungtieren ab einer Woche nach Geburt einen deutlichen Anstieg von IgG1, IgG2a und vor allem IgE. Bei neun Wochen und sieben Monate alten BN-Ratten ist der Effekt geringer ausgeprägt, im Vergleich zu den Kontrollgruppen aber besonders für das Th2-spezifische IgE noch sehr deutlich. Auch bei Lewis-Ratten, die bevorzugt mit einer inflammatorischen Reaktion antworten, zeigte vor allem die Gabe des mitogenen mAk JJ316 kurz nach Geburt und die Untersuchung von drei Monate alten Tieren eine stärkere Produktion Th2-typischer Immunglobuline. Untersuchungen mit zuvor OVA-Pertussistoxin-immunisierten Ratten beiderlei Stämme zeigten eine geringere Auswirkung der Gabe von JJ316, aber auch hier teilweise eine Verstärkung der humoralen Immunreaktion. In parallel in der Arbeitsgruppe durchgeführten intrazellulären Färbungen konnte teilweise ein Anstieg des IL-4 und IL-10 nachgewiesen werden und RNase-Protektion-Assays zeigten einer Erhöhung der IL4- und IL-10mRNA.

Der Einfluss des CD28-Systems auf die Differenzierung der T-Helfer-Zellen spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (z. B. Rheumatoide Arthritis, Diabetes Mellitus Typ II), Abwehr von Infektionen oder Transplantatabstoßungen. Eingriffe in dieses System könnten vielleicht in Zukunft neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen.

6. Literaturverzeichnis

Arase, H., Arase N., Nakagawa, K., Good, R.A., and Onoe, K. (1993) NK 1.1⁺CD4⁺CD8⁻ thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J. Immunol.* 23 (1):307-10

Arreaza, G.A., Cameron, M.J., Jaramillo, A., Gill, B.M., Hardy, D., Laupland, K.B., Rapoport, M.J., Zucker, P., Chakrabarti, S., Chensue, S.W., Qin, H.Y., Singh, B., and Delovitch, T.L. (1997) Neonatal activation of CD28 signaling overcomes T cell anergy and prevents autoimmune diabetes by an IL-4-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 100 (9):2243-53

Aruffo, A., and Seed, B. (1987) Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8573-77

Azuma, M. Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366 (6450):76-79

Azuma, M., Phillips, J.H., and Lanier, L. (1993) CD28⁻ T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J. Immunol.* 150 (4):1147-59

Azuma, M., Yssel, H., Phillips, J.H., Spits, H., and Lanier, L.L. (1993). Functional expression of B7/BB1 on activated T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177 (3):845-50

Beijleveld L.J.J., Groen, H., Broeren, C.M., Klatter, F.A., Kampinga, J., Damoiseaux, J.G.M.C., van Breda Vriesman, P.J.C. (1996) Susceptibility to clinically manifest cyclosporin A (CsA)-induced autoimmune disease is associated with interferon-gamma producing CD45RC⁺RT6⁻ T helper cells. *Clin. Exp. Immunol.* 105 (3):486-96

Bradding, P., Feather, I.H., Howarth P.H., Muller, R., Roberts, J.A., Britten, K., Bews, J.P., Hunt T.C., Okayama, Y., Heusser, C.H., Bullock, G.R., Church, M.K., and Holgate, S.T. (1992) Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J. Exp. Med.* 176 (5):1381-86

Bretscher, P. and Cohn, M., (1970) A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169 (950):1042-49

Brinkmann, V., Kinzel, B., and Kristofic, C. (1996) TCR-independent activation of human CD4⁺45R0⁻ T cells by anti-CD28 plus IL-2: Induction of clonal expansion and priming for a Th2 phenotype. *J. Immunol.* 156 (11):4001-06

Brüggemann, M. Free, J., Diamon, A., Hobard, J., Cobold, S., Waldmann, H. (1986). Immunoglobulin heavy chain locus of the rat: striking homology to mouse antibody genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (16):6075-79

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

Cameron, M.J., Arreaza, G.A., Zucker, P., Chensue, S.W., Strieter, R.M., Chakrabarti, S., and Delovitch, T.L. (1997) IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J. Immunol.* 159 (10):4686-92

Cameron, M.J., Meagher, C., Delovitch, T.L. (1998) Failure in immune regulation begets IDDM in NOD mice. *Diabetes Metab. Rev.* 14 (2):177-85

Carter, P., Bazin, H. (1980). Immunology. In *The Laboratory Rat*, Vol.2, S. 181-212. Academic Press, New York, USA

Chen, L., Ashe, S., Bradey, W.A., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Ledbretter, J.A., McGowan, P., Linsley, P.S. (1992) Costimulation of anti-tumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4 *Cell* 71 (7):1093-1102

Clark, G.J., and Dallman, M.J. (1992) Identification of a cDNA encoding the rat CD28 homologue. *Immunogenetics* 35 (1):54-57

Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., and Bottomly, K. (1995) Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 182(5):1591-96

Constant, S., and Bottomly, K. (1997) Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15:297-322

Corry, D.B., Reiner, S.LI, Linsley, P.S., and Locksley R.M. (1994) Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 153 (9):4142-48

Croft, M., and Swain, S.L. (1995) Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J. Immunol.* 154 (9):4269-82

Cuturi, M.C., Josien, R., Cantarovich, D., Bugeon, L., Anegon, I., Menoret, S., Smit, H., Douillard, P., and Soulillou, J.P. (1994) Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur. J. Immunol.* 24 (7):1627-31

Daikh, D.I., Finck, B.K., Linsley, P.S., Hollenbaugh, D., and Wofsy, D. (1997) Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways. *J. Immunol.* 159 (7):3104-08

Damle, N.K., Doyle, L.V., Grosmaire, L.S., and Ledbretter, J.A. (1988). Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 140 (6):1753-61

Der Balian, G.P., Slack, J., Clevinger, B.L., Bazin, H., and Davie, J.M. (1980) Subclass restriction of murine antibodies. III. Antigens that stimulate IgG3 in mice stimulate IgG2c in Rats. *J. Exp. Med.* 152:209-18

Ferrick, D.A., Schrenzel, M.D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W.G., and Lepper, H. (1995) Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo. *Nature* 373 (6511):255-57

Finck, B.K., Linsley, P.S., and Wofsy, D. (1994). Treatment of murine lupus with CTLA-4-Ig. *Science* 265 (5176):1225-27

Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J., and Nadler, L.M. (1987). B7, a B-cell restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol.* 139 (10):3260-67

Freedman, A.S., Freeman, G., Rhyhart, K., and Nadler, L.M. (1991). Selective induction of B7/BB-1 on interferon- γ stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell. Immunology* 137 (2):429-37

Freeman, G.J., Lombard, D.B., Gimmi, C.D., Brod, S.A., Lee, K., Laning, J.C., Hfler, D.A., Dorf, M.E., Gray, G.S., Reiser, H., June, C.H., Thompson, C.B., Nadler, L.M. (1992) CTLA-4 and CD28 mRNA are co-expressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J. Immunol.* 149 (12):3705-801

Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A., Lombard, L.A., Gray, G.S., and Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counterreceptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262 (5135):909-11

Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., McKnight, A.J., Kim, J., Du, L., Lombard, D.B., Gray, G.S., Nadler, L.M., and Sharpe, A.H. (1993) Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science* 262 (5135):907-09

Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Anumanthan, A., Bernstein, G.M., Ke X.Y., Rennert, P.D., Gray, G.S., Gribben, J.G., and Nadler, L.M. (1995) B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 2 (5):523-32

Geppert, T.D., and Lipsky, P.E. (1987) Accessory cell independent proliferation of human T4 cells stimulated by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J. Immunol.* 138 (6):1660-66

Gimmi, C.D., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Sugita, K., Freedman, A.S., Morimoto, C., and Nadler, L.M. (1991). B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (15):6575-79

Gollob, K.J., and Coffmann, R.L. (1994) A minority subpopulation of CD4⁺ T cells directs the development of naive CD4⁺ T cells into IL-4-secreting cells. *J. Immunol.* 152 (11):5180-88

Gowans, J.L. and McGregor, D.D. (1965): The immunological activities of lymphocytes. *Progr. Allergy* 9, 1

Green, J.M., Noel, P.J., Sperling A.I., Walunas, T.L., Gray, G.S., Bluestone, J.A., Thompson, C.B. (1994) Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1(6):501-08

Groen, H., Klatter, F.A., van Petersen, A.S., Pater, J.M., Nieuwenhuis, P., Kampinga, J. (1993). Composition of rat CD4⁺ resting memory T-cell pool is influenced by major histocompatibility complex. *Transpl. Proc.* 25 (5):2782-83

Gross, J.A., St. John, T., and Allison, J.P. (1990) The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28: molecular cloning and cell surface expression. *J. Immunol.* 144 (8):3201-10

Gross, J.A., Callas, E., and Allison, J.P. (1992) Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.* 149 (2):380-88

Hanke, G. (1997) T-Zell-Rezeptor unabhängige Aktivierung von T-Lymphozyten über das CD28-Molekül der Ratte in vivo und in vitro. In Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg: Universität Würzburg)

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

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

Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T-cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356 (6370):607-09

Hathcock, K.S., Laszlo, G., Dickler, H.B., Bradshaw, J. Linsley, P., and Hodes, R.J. (1993) Identification of an alternative CTLA-4 ligand co-stimulatory for T cell activation *Science* 262 (5135):905-07

Janeway, C.A.jr., und Travers, P. (1995) Die T-Zell-vermittelte Immunität. In *Immunologie*, S. 281-329. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

Jeannin, P., Herbault, N., Delneste, Y., Magistrelli, G., Lecoanet-Henchoz, S., Caron, G., Aubry, J.P., and Bonnefoy, J.Y. (1999) Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J. Immunol.* 162 (4):2044-48

Jenkins, M.K., Chen, C., Jung, G., Mueller, D.L., and Schwartz, R.H. (1990). Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 144 (1), 16-22

Joseph, S.B., Miner, K.T., and Croft, M. (1998) Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF. *Eur. J. Immunol.* 28 (1):277-89

June, C.H., Ledbetter, J.A., Gillespie, M.M., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1987) T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7(12):4472-81

- Kamogawa, Y., Minasi, L.E., Carding, S.R., Bottomly, K., and Flavell, R.A. (1993). The relationship of IL-4- and IFN- γ -producing T cells studied by ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 75 (5):985-95.
- King C.L., Stupi, R.J., Craighead, N. June, C.H., and Thyphronitis, G. (1995) CD28 activation promotes Th2 subset differentiation by human CD4⁺ cells. *Eur. J. Immunol.* 25 (2):587-95
- King, C.L., Xianli, J., June, C.H., Abe, R., and Lee, K.P. (1996) CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. *Eur. J. Immunol.* 26 (10):2448-55
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., and Köhler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362 (6417):245-48
- Kuchroo, V.K., Martin, C.A., Greer, J.M., Ju, S.-T., Sobel, R.A., and Dorf, M.E. (1993). Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 151 (8):4371-82
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L, Nabavi, N., and Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: applicaiton to autoimmuno-disease therapy. *Cell* 80 (5):707-18
- Kühn, R., Rajewsky, K., and Müller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4-deficient mice. *Science* 254 (5032):707-10
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75 (2):263-74
- Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Philips, J.H., Linsley, P.S., Okumara, K., Ito, D., and Azuma, M. (1995) CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar co-stimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production and generation of CTL. *J. Immunol.* 154 (1):97-105
- Lenschow, D.J., Zeng, Y., Thistlewaite, J.R., Montag, A., Brad, W., Gibson, M.L., Linsley, P.S. and Bluestone, J.A. (1992) Long-term survival of xenogenic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg *Science* 257 (5071):789-92
- Lenschow, D.J., Herold, K.C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Quin, H-Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996) CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 5 (3):285-93

Liew, F., Y., Millot, S., Li, Y., Lelchuk, R., Chan, W.L., and Ziltener, H. (1989). Macrophage activation by intereron-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)-3 and IL-4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 19(7):1227-32

Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., and Ledbretter, J.A. (1991) Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173 (3):721-30

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbretter, J.A., (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174 (3):561-69

Li-Weber, M., and krammer, P. (1998) Involvement of Jun and Rel proteins in up-regulation of Interleukin-4 gene activity by the T-cell accessory molecule CD28. *J. Biol. Chem.* 273: in press

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

Mathieson, P.W. (1992). Mercuric chloride induced autoimmunity. *Autoimmunity* 13 (3):243-47

Monaco, J.J. (1992). A molecular model of MHC class I restricted antigen processing. *Immunol. Today* 13 (5):173-79

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

Nabavi, N., Freeman, G.J., Gault, A., Godfrey, D., Nadler, L.M., and Glimcher, L.H. (1992) Signaling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 360 (6401):266-68

Nakumara, T., Lee, R.K., Nam, S.Y., Podack, E.R., Bottomly, K. and Flavell, R.A. (1997) Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J. Immunol.* 158(6):2648-53

Nandi, D., Gross, J.A., and Allison, J.P. (1994). CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells. *J. Immunol.* 152 (7):3361-69

Natesan, M., Razi-Wolf, Z., and Reiser, H. (1996) Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. *J. Immunol.* 156 (8):2783-91

Nunes, J., Klasen, S., Ragueneau, C., Pavon, D., Couez, C., Mawas, M., Bagnasco M., and Olive, D. (1993) CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events. *Int Immunol.* 5:311-15

Palmer, L.D., Saha, B., Hodes, R.J. and Abe, R. (1996) The role fo CD28 costimulation in immune-mediated responses against mouse mammary tumor viruses. *J. Immunol.* 156 (6):2112-08

Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76 (2):241-51

Pfeiffer, C., Murray, J., Madri, J., and Bottomly, K. (1991) Selective activation of Th1 and Th2 like cells in vivo: response to human collagen IV. *Immunity* 123:65-69

Pfeiffer, C., Stein, J., Southwood, S., Ketelaar, H., Sette, A., and Bottomly, K. (1994) Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 181:1569-74

Romagnani, S. (1992) Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol. Today* 13 (10):379-81

Rulifson, I.C., Sperling, A.I., Fields, P.E., Fitch, F.W., and Bluestone, J.A. (1997) CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J. Immunol.* 158 (2):658-65

Rodriguez-Palmero, M., Hara, T., Thumbs, A., and Hünig, T. (1999) Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 29:3914-24

Sakai, T., Agui, T., Muramatsu, Y., Nagasawa, H., Himeno, K., and Matsumoto, K. (1995) Low level ov immunoglobulin G2a sublcass correlates with a deficiency in T helper cell function in LEC mutant rats. *J. Vet. Med. Sci.* 57 (3):527-29

Sadick, M.D., Heinzl, F.P., Holaday, B.J., Pu, R.T., Dawkins, R.S., and Locksley, R.M. (1990) Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin-4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 171 (1):115-27

Schulze-Koops, H. Davis, L.S., Haverty, T.P., Wacholtz, M.C., and Lipsky, P.E. (1998) Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatiod arthritis after treatment with a non-depleting humanized monoclonal antibody to CD4. *J. Rheumatol.* 25 (11):2065-76

Schulze-Koops, H., Lispy, P.E., and Davis, L.S. (1998) Human memory T cell differentiation into Th2-like effector cells is dependent on IL-4 and CD28 stimulation and inhibited by TCR ligation. *Eur. J. Immunol.* 28 (8):2517-29

Schwartz, R.H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248 (4961):1349-56

Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., and Fazekas de St. Groth, B. (1992). The presence of interleukin-4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 176 (4):1091-98

Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W.E. (1993). IL-12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for IFN- γ production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (21):10188-92

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kündig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993) Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261 (5121):609-12

Siefken, R., Kurrle, R., and Schwinzer, R. (1997) CD28-mediated activation of resting human T cells without costimulation of the CD3/TCR complex. *Cell. Immunol.* 176:59-65

Soares, M., Havaux, X., Nisol, F., Bazin, H., Latinne, D. (1996). Modulation of rat B cell differentiation *in vivo* by the administration of an anti- μ monoclonal antibody. *J. Immunol.* 156 (1):108-18

Street, N.E., Schumacher, J.H., Fong, T.A., Bass, H., Fiorentino, D.F., Leverah, J.A., and Mosmann, T.R. (1990). Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 144 (5):1629-39

Symington, F.W., Brady, W., and Linsley, P.S. (1993). Expression and function of B7 on human epidermal langerhans cells. *J. Immunol.* 150 (4):1286-95

Tacke, M. (1995). Expression und Funktion des CD28-Moleküls in der Ratte. In Institut für Virologie und Immunbiologie (Würzburg: Universität Würzburg)

Tacke, M., Hanke, G., Hanke, T. and Hünig, T. (1997) CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells *in vitro* and *in vivo* without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur. J. Immunol.* 27:239-47

- Tan, P., Anasetti, C., Hansen, J.A., Melrose, J., Brunvand, M., Bradshaw, J., Ledbretter, J.A., and Linsley, P.S. (1993) Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J. Exp. Med.* 177 (1):165-73.
- Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., and Bottomly, K. (1997) Strength of TCR Signal Determines the Costimulatory Requirements for Th1 and Th2 CD4⁺ T Cell Differentiation. *J. Immunol.* 159 (12):5956-63
- Tao, X., Grant, C., Constant, S. and Bottomly, K. (1997) Induction of IL-4-producing CD4⁺ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J. Immunol.* 158(9):4237-44
- Townsend, S.E., Allison, J.P. (1993) Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells *Science* 259 (5093):368-70
- Turka, L.A., Linsley, P.S., Lin, H., Brady, W., Leiden, J.M., Wei, R.Q., Gibson, M., Zheng, X.G., Myrdal, S., Gordon D. et al. (1992) T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89 (22):11102-05
- Van Gool, S.W., Ceuppens, J.L., Walter, H., and de Boer, M. (1994). Synergy between cyclosporin A and a monoclonal antibody to B7 in blocking alloantigen-induced T-cell activation. *Blood* 83 (1):176-83
- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.F., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994) CTLA-4 can function as negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1 (5):405-13
- Yoshimoto, T., and Paul, W.E. (1994) CD4^{pos}, NK1.1^{pos} T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* 179 (4):1285-95
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248 (450):701-02

DANKE

Herrn Professor Thomas Hünig für die freundliche Unterstützung bei meiner Doktorarbeit. Er war ein geduldiger Lehrer, zu dem ich mit allen Fragen zu jeder Zeit kommen konnte und der immer ein offenes Ohr für anstehende Probleme hatte.

Frau Dipl.-Pharmakologin Marta Rodriguez-Palmero, die mich in der täglichen Laborarbeit hervorragend und stets geduldig angeleitet hat, die mir die Feinheiten des wissenschaftlichen Arbeitens beibrachte und die einen sehr grossen Anteil an meiner Arbeit hat. Am wichtigsten aber war mir die nette und freundschaftliche Atmosphäre, die dafür gesorgt hat, dass ich die Zeit im Labor immer in positiver Erinnerung behalten werde.

Dem ganzen Team der Arbeitskreise Hünig, Herrmann und Schimpl, die bei den kleinen alltäglichen Problemen immer als Ansprechpartner zur Verfügung standen und eine zwar arbeitssame aber auch immer nette Stimmung im Labor verbreiteten.

Meinen Eltern, die mich seit Jahren liebevoll unterstützen, immer für mich da sind und mir die Freiheit geben, meinen Weg zu gehen.

LEBENS LAUF

Name: Alexander Thumbs

Geburtsdatum: 18. Juli 1973

Geburtsort: Nürnberg

Anschrift: Rimplarer Straße 8

97080 Würzburg

☎ 0931 - 23 32 9

✉ alex_thumbs@hotmail.com

Schulbildung: September 1979-Juli 1983 Grundschule Münchberg

September 1983-Juli 1992 Gymnasium Münchberg; Abschluß 1992 mit Abitur (2,0)

Fremdsprachen: Englisch

Französisch

Wehrdienst: 1. Juli 1992 bis 30. September 1993 Wehrdienst in Bayreuth

Studium: Betriebswirtschaftslehre an der Universität Bayreuth (11/93 - 04/94)

Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (seit 05/94-10/00)

abgeschlossen Oktober 2000 (Note 1,8)

Famulaturen: Unfallchirurgie *Klinikum Hof (08/96 - 10/96)*

Innere Medizin *Wilhelminenspital Wien (03/98 - 04/98)*

Urologie *St Peter's Hospital / London / GB (08/98 - 09/98)*

Unfallchirurgie *BG Unfallklinik Murnau (09/98 - 10/98)*

Allgemeinmedizin *Gemeinschaftspraxis Hoffmann/Dr. Ströhla (03/99)*

Praktisches Jahr: Herz-, Gefäß- und Thoraxchirurgie (10/99 - 02/00)
St. Luke's Episcopal Hospital / Houston / Texas / USA

Unfall- und Allgemeinchirurgie (02/00 - 06/00)
Rätisches Kantons- und Regionlspital Chur / Schweiz

Innere Medizin (06/00 - 09/00)
Leopoldina - Krankenhaus Schweinfurt

Veröffentlichungen: Triggering of T cell proliferation through CD 28 induces GATA-3 and promotes T helper tpye 2 differentiation in vitro and in vivo
Rodriguez-Palmero, M., Hara, T., Thumbs, A., and Hünig, T.
European Journal of Immunology 1999, 29

Würzburg, November 2000

Alexander Thumbs