

4. Ergebnisse

4.1 Murine *in vitro*-Versuche

4.1.1 Charakterisierung des anti-CD2 mAk 12-15

Durch Gabe des anti-Maus CD2 mAk 12-15 konnte in der Vergangenheit die Abstoßung von Allo- und Xenotransplantaten verhindert werden^{91, 122}. Außerdem ist bekannt, dass dieser anti-CD2 mAk die zytotoxische Lymphozyten-Reaktion inhibiert^{123, 124} und *in vivo* zu einer verminderten Aktivierbarkeit von T-Zellen führt¹²⁵. Um in einem ersten Schritt einen genaueren Einblick in das inhibitorische Potential dieses anti-CD2 mAk zu bekommen, wurden *in vitro*-Versuche mit stimulierten Zellen durchgeführt. Stimulierte Lymphozyten wurden zum einen verwendet, um eine ausreichende Proliferation bzw. Zytokinsynthese zu gewährleisten, und zum anderen, da sich bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ebenfalls verstärkt aktivierte Zellen finden. Ziel dieser Untersuchungen war, die Proliferation und Zytokinsynthese nach Zugabe des anti-CD2 mAk 12-15 zu analysieren. Dazu wurden stimulierte Lymphozyten der Milz, aus mesenterialen Lymphknoten sowie aus der Lamina propria mit dem anti-CD2 mAk 12-15 (10 µg/ml) inkubiert und die durch diesen Antikörper induzierte Hemmung von Proliferation bzw. Zytokinsynthese bestimmt.

4.1.1.1 *Der anti-CD2 mAk 12-15 hemmt die Proliferation*

Ob der anti-CD2 mAk 12-15 das Potential hat, die Proliferation aktivierter Zellen zu inhibieren, sollte mittels stimulierter Splenozyten (2×10^6 /ml) untersucht werden. Dazu wurden Splenozyten isoliert, mit CFSE markiert, über CD3/CD28 stimuliert, und zusätzlich mit dem anti-CD2 mAk 12-15 inkubiert. Als Kontrolle wurden Ansätze mit stimulierten Zellen ohne Zugabe des anti-CD2 mAk verwendet. Das Wachstum dieser Zellen innerhalb von 3 Tagen wurde als 100% gesetzt und entsprechend die Hemmung der Proliferation durch den anti-CD2 mAk 12-15 berechnet. Wie Abbildung 4.1 zeigt, konnte die Proliferation aktivierter Splenozyten durch den anti-CD2 mAk 12-15 signifikant verringert werden.

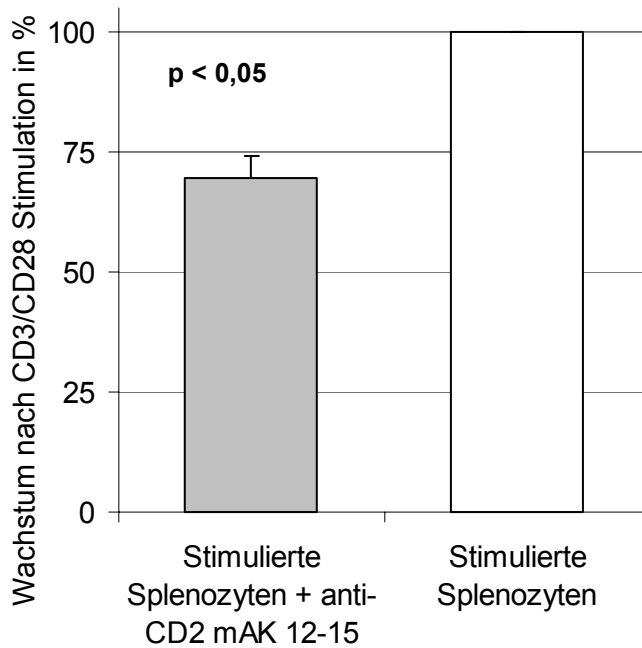


Abb. 4.1: Prozentuale Inhibition der Proliferation von CD3/CD28-stimulierten murinen Splenozyten ($n = 15$) durch die Zugabe des anti-CD2 mAk 12-15. Die Messung der Proliferation erfolgte nach 3 Tagen. Die Zugabe dieses anti-CD2 Antikörpers bewirkte eine signifikante Hemmung der Proliferation.

Damit ist der anti-CD2 mAk 12-15 in der Lage, die CD3/CD28 induzierte Proliferation von Splenozyten zu inhibieren.

4.1.1.2 Der anti-CD2 mAk 12-15 moduliert die Zytokinsekretion

In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob der anti-CD2 mAk 12-15 auch in der Lage ist, das Zytokinprofil aktivierter Lymphozyten zu modulieren. Um dies zu untersuchen, wurden isolierte Zellen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) über CD3 stimuliert und über 48 Stunden mit $10 \mu\text{g/ml}$ des anti-CD2 mAk 12-15 inkubiert. Die Konzentration der während dieser Zeitspanne in den Kulturüberstand sezernierten Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β) wurde anschließend mittels ELISA bestimmt (siehe 3.2.10). Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde die Zytokinproduktion stimulierter Zellen gleich 100% gesetzt und mit der von stimulierten und zusätzlich mit dem anti-CD2 mAk 12-15 inkubierten Zellen verglichen. Wie Abbildung 4.2 zeigt, konnte der anti-CD2 mAk 12-15 die Produktion von IL-2 ($42,1 \pm 5,6\%$), IL-4 ($64,9 \pm 9,6\%$) sowie die Sekretion von IFN- γ ($62,6 \pm 3,0\%$) signifikant verringern ($p = 0,005$). Die Synthese von IL-6 wurde durch Inkubation mit dem anti-CD2 mAk signifikant gesteigert ($184,1 \pm 24,3\%$; $p < 0,05$). Eine Modulation von TNF- α oder TGF- β konnte nicht nachgewiesen werden.

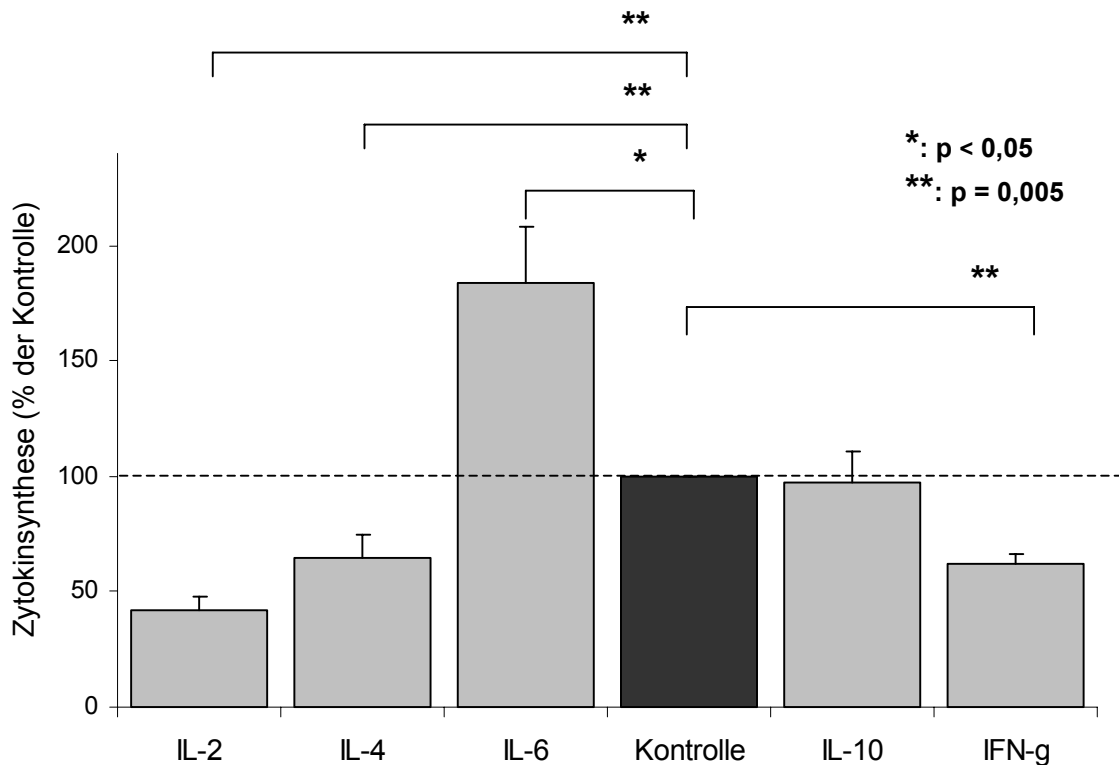


Abb. 4.2: Modulation der Zytokinsynthese CD3/CD28 stimulierter, muriner Splenozyten (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10: $n = 5$; IFN- γ : $n = 9$) durch Inkubation mit dem anti-CD2 mAk 12-15.

Trotzdem könnte durch die Hemmung vor allem von IFN- γ , und IL-2 eine therapeutische Wirkung des anti-CD2 mAk 12-15 über eine Modulation von Zytokinen möglich sein.

4.1.1.3 *Der anti-CD2 mAk 12-15 führt in vivo weder zur Depletion noch zur Induktion regulatorischer T-Zellen*

Das für weitere Untersuchungen der Wirkung des anti-CD2 mAk gewählte CED-Tiermodell war das Modell der adoptiven Transfercolitis. Um auszuschließen, dass der anti-CD2 mAk 12-15 transferierte T-Zellen depletiert und so möglicherweise die Entwicklung einer Transfercolitis verhindert, wurden 4×10^6 CFSE-markierte T-Zellen auf Rag1 defiziente Mäuse transferiert. Die Rezipienten wurden mit anti-CD2 mAk bzw. Kontroll-Antikörpern (Ratten-IgG sowie ein anti-CD4 mAk (GK-1.5) als Kontroll-Antikörper für die Depletion) behandelt. Nach 24 Std. wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut isoliert und es wurde durchflusszytometrisch der Prozentsatz der darin enthaltenen CFSE-markierten sowie der von CD25⁺/CFSE⁺ bzw. CD103⁺/CFSE⁺ Zellen

bestimmt. Die Bestimmung der $CD25^+/CFSE^+$ bzw. $CD103^+/CFSE^+$ Zellen erfolgte, um eine mögliche Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die Gabe des anti-CD2 mAk 12-15 zu untersuchen.

Nach 3 Tagen wurden die Mäuse getötet, Splenozyten, Lymphozyten des Blutes, der mesenterialen Lymphknoten sowie des Colons isoliert und ebenfalls hinsichtlich CFSE-markierter Zellen und der Sequenz regulatorischer T-Zellen analysiert.

Bei dem Vergleich der nach 24 Stunden entnommenen Blutproben konnte kein Unterschied im Prozentsatz CFSE-markierter Zellen zwischen der Kontrollgruppe und der anti-CD2 mAk behandelten Gruppe festgestellt werden (Abb. 4.3, A und B). Wie erwartet fanden sich in den Lymphozyten der mit GK1.5 behandelten Tiere weniger CFSE-markierte Zellen (Abb. 4.3C).

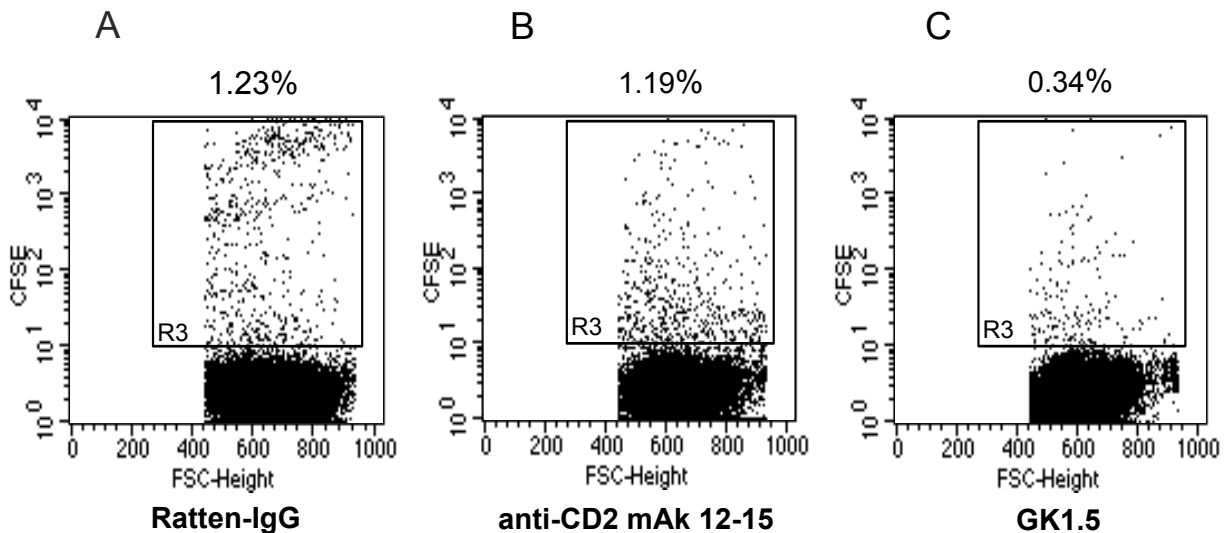


Abb. 4.3: Keine Unterschiede beim Nachweis $CD4^+$, CFSE-markierter T-Zellen im peripheren Blut von anti-CD2 bzw. Kontroll-mAk behandelten $Rag1^{-/-}$ Mäusen einen Tag nach Transfer. Die Mäuse wurden mit Kontroll-Antikörper (A: Ratten-IgG), anti-CD2 mAk (B: 12-15), bzw. einem, in der Literatur als depletierend beschriebenen Antikörper (C: GK1.5) behandelt. Die Prozentangaben geben die % der CFSE-positiven Zellen an.

Auch die Prozentzahlen von $CD25^+/CFSE^+$ bzw. $CD103^+/CFSE^+$ Zellen im peripheren Blut wiesen nach 24 Stunden zwischen den Gruppen keine Unterschiede auf (nicht gezeigt). Der Vergleich CFSE-positiver Zellen aus Milz, mLK oder Lamina propria anti-CD2 mAk behandelter Mäuse 72 Stunden nach Transfer ergab ebenfalls keine Unterschiede im Vergleich zu Zellen der Kontrollmäuse (nicht gezeigt). Der Nachweis CFSE-markierter Zellen im Blut war nach 3 Tagen nicht mehr möglich.

Diese Versuche belegen, dass die Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 zu keiner Depletion der transferierten T-Zellen führt. Sie geben darüber hinaus keine Hinweise darauf, dass durch diesen anti-CD2 mAk regulatorische T-Zellen induziert werden.

4.2 *In vivo*-Ergebnisse

4.2.1 Adoptiver Transfer CD4 positiver ConA-Blasten

4.2.1.1 *Die präventive Gabe des anti-CD2 mAk 12-15 schützt vor T-Zellblasten-Transfercolitis*

Die vorangegangenen *in vitro*-Versuche haben gezeigt, dass der anti-CD2 mAk 12-15 in der Lage ist, nicht nur die Proliferation stimulierter T-Zellen zu vermindern, sondern auch die Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine zu hemmen. *In vivo* Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen, dass der anti-CD2 mAk 12-15 sowohl zur T-Zellenergie führt⁶⁷, als auch das Überleben nach Transplantationen^{91, 125} verlängern kann. Um das präventive Potential des anti-CD2 mAk 12-15 *in vivo* im Modell der adoptiven Transfercolitis zu testen wurden mit ConA aktivierte, CD4 positive T-Zellen in Rag1 defiziente Mäuse transferiert. So behandelte Mäuse entwickeln innerhalb von 2-3 Wochen eine Transfercolitis als Folge einer dysregulierten T-Zellaktivierung. Diese ist klinisch gekennzeichnet durch Gewichtsverlust und Diarrhöe. Die Antikörper (anti-CD2 mAk 12-15: n = 16 bzw. Ratten-Kontroll-IgG: n = 13) wurden präventiv verabreicht. Das heißt, es wurde mit einer Aufsättigungskonzentration von 400 µg i.p. zum Zeitpunkt des T-Zelltransfers begonnen, ihr folgte die Gabe von 200 µg i.p./Woche.

Etwa 2 Wochen nach adoptivem Transfer traten die ersten Krankheitszeichen auf. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tiere mindestens 3 mal wöchentlich klinisch beurteilt, Tiere mit einem Gewichtsverlust von mehr als 20% und/oder offensichtlichen Zeichen von Schmerz und/oder Lethargie wurden mittels CO₂-Inhalation oder zervikaler Dislokation getötet. Wie die Kaplan-Meier Analyse in Abbildung 4.4 zeigt, konnte durch die präventive Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 die Überlebenszeit der Mäuse signifikant verlängert werden ($p < 0,001$).

Während alle mit Ratten-IgG behandelten Kontrollmäuse innerhalb von 35 Tagen starben bzw. auf Grund starker Krankheitszeichen getötet werden mussten, überlebten 69% der mit dem anti-CD2 mAk 12-15 behandelten Tiere diesen Zeitraum. Zu Versuchsende zeigten 50% der 12-15 behandelten Tiere keine klinischen Zeichen von Colitis (Abb. 4.4).

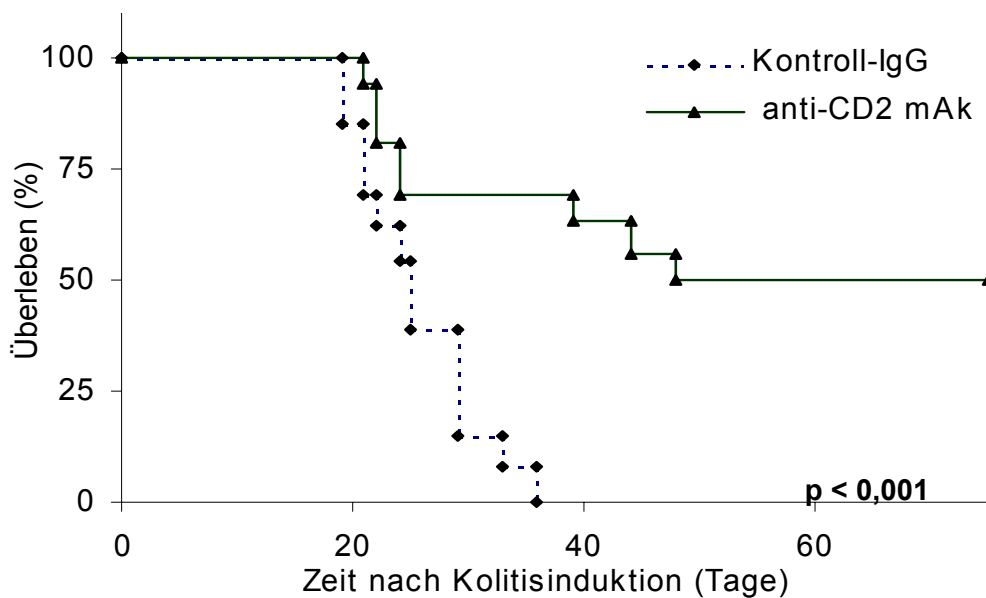


Abb. 4.4: Kaplan-Meier Überlebensanalyse nach präventiver Behandlung von Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15. Während alle Kontroll-Tiere (---; $n = 13$) innerhalb von 35 Tagen nach Transfer starben, waren 50% der anti-CD2 behandelten Tiere (—; $n = 16$) Langzeit-Überlebende.

Vergleicht man den gemittelten Gewichtsverlauf von Mäusen der Kontroll-Gruppe mit dem der langzeitüberlebenden Mäuse der anti-CD2-behandelten Gruppe, fällt auf, dass die langzeitüberlebenden anti-CD2 mAk behandelten Mäuse während des Versuches sogar noch an Gewicht zunahmten (Abb. 4.5).

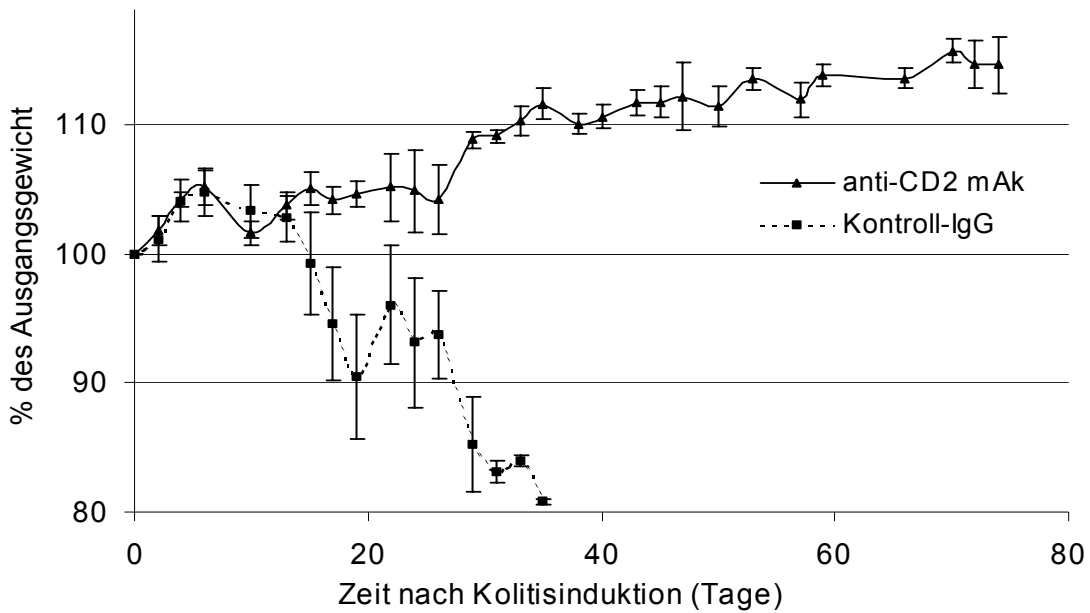


Abb. 4.5: Gewichtsverlauf von Ratten-IgG behandelten Kontroll- (---) und anti-CD2 mAk behandelten Versuchsmäusen (—). Angegeben sind % vom Ausgangsgewicht am Tag des Transfers. Die präventive Behandlung der Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15 verhinderte eine Gewichtsabnahme der langzeitüberlebenden Mäuse.

Übereinstimmend mit den klinischen Daten ergaben makroskopische Untersuchungen zu Versuchsende eine signifikant stärkere Entzündung im Colon der mit Kontroll-IgG behandelten Mäuse gegenüber den behandelten Mäusen.

So zeigten sich bei den Mäusen der Kontrollgruppe vermehrt Wandverdickungen, Schleimhauterythre und Verwachsungen (Abb. 4.6A: Kontrollmaus, Abb. 4.6B anti-CD2 mAk behandelte Maus).

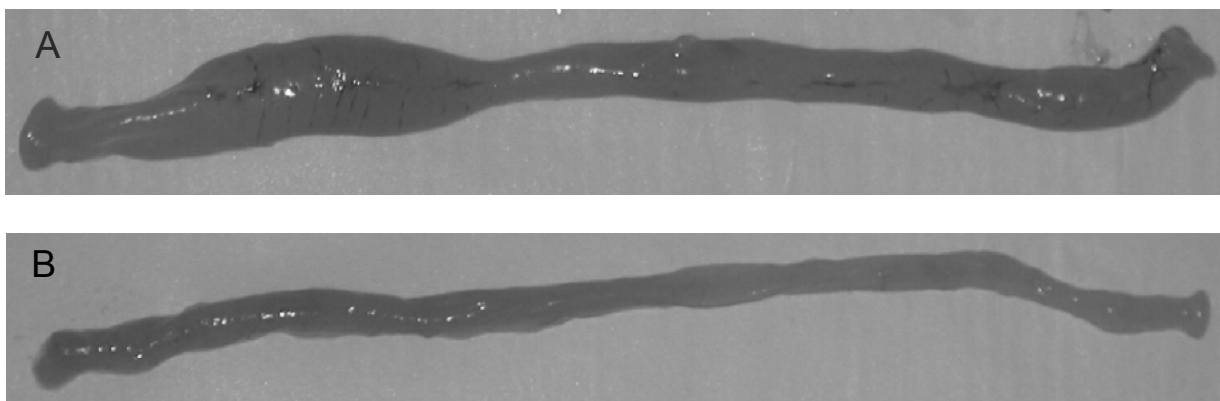


Abb. 4.6: Präventive Behandlung von $Rag1^{-/-}$ Transfercolitis-Mäusen mit dem anti-CD2 mAk 12-15 führte zu einer makroskopisch signifikant geringeren Entzündung des Colons. A: Colon einer mit Kontroll-IgG behandelten Maus (Score: 3); B: Colon einer mit anti-CD2 mAk 12-15-behandelten Maus (Score: 1).

Die Abbildung 4.7A stellt den makroskopischen Score von Ratten-IgG behandelten Kontroll- und anti-CD2 mAk behandelten Versuchsmäusen gegenüber (Abb. 4.7A: anti-CD2 behandelte Mäuse (grau): $2,06 \pm 0,35$ vs. Kontrollmäuse (weiß): $3,2 \pm 0,7$; $p < 0,05$).

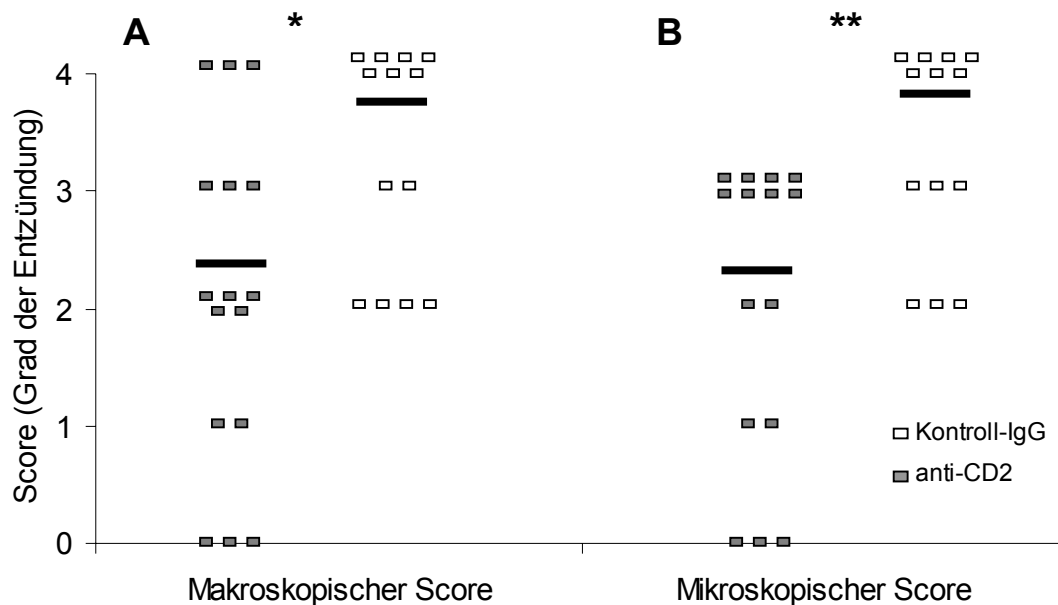


Abb. 4.7: Makroskopischer (A) und mikroskopischer (B) Score vom Colon der präventiv mit anti-CD2 mAk (grau) bzw. mit Kontroll-IgG (weiß) behandelten Tiere. Ein Score von 0 bedeutet keine Entzündung, einer von 4 die schwerste Form einer Entzündung. Der Grad der Signifikanz wurde über den Mann-Whitney-U Test ermittelt und ist wie folgt angegeben: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Auch die histologische Untersuchung des Colon aus Mäusen beider Gruppen ergab signifikante Unterschiede im Grad der Entzündung. Bei mit anti-CD2 mAk behandelten Tieren waren sowohl die colitisbedingten Wandverdickungen des Darms als auch die Veränderungen der Kryptenarchitektur weniger ausgeprägt. Ferner war die Anzahl der Infiltrationen vermindert, und es fand sich weniger durch Mitosen und Schorfbildung gekennzeichnetes regeneratives Gewebe (siehe Abb. 4.8).

Dieses Ereignis spiegelt sich im insgesamt niedrigeren mikroskopischen Score der mit anti-CD2 mAk 12-15 behandelten Mäuse ($2,0 \pm 0,3$; $n = 15$) im Vergleich zu den Kontrollmäusen ($3,3 \pm 0,24$; $n = 13$) wider ($p < 0,001$; Abb. 4.7B).

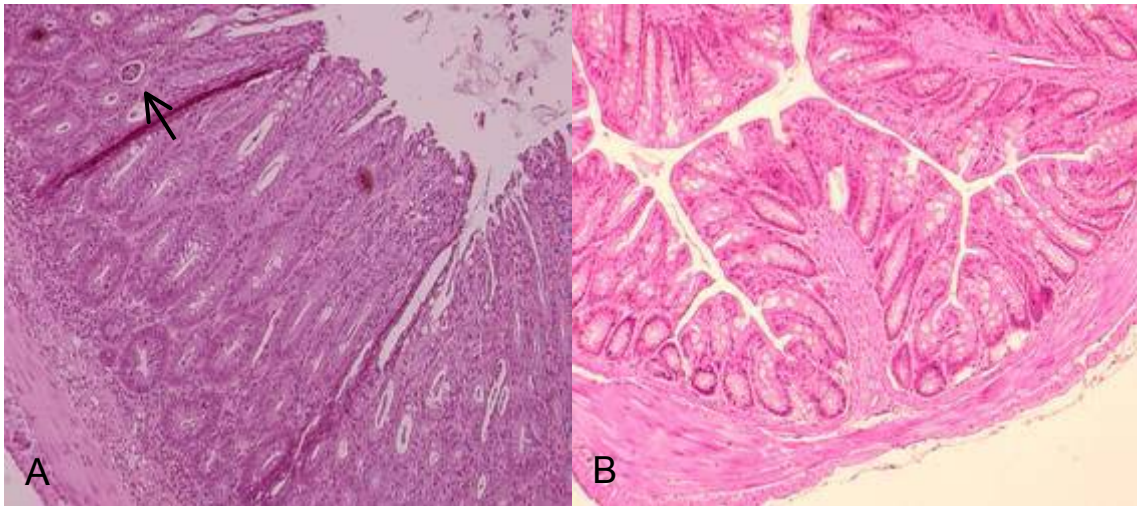


Abb. 4.8: Histologischer Vergleich des Colons einer mit Kontroll-IgG behandelten (A) und einer mit anti-CD2 mAK 12-15 behandelten Maus (B) nach adoptivem Transfer von ConA stimulierten, CD4 positiven Blasten. In (A) sind deutlich die aufgelöste Kryptenstruktur, entzündliche Infiltrate, sowie ein Kryptenabszess (→) ersichtlich.

Analysen der zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende entnommenen Blutproben der beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Hämoglobingehaltes, sowie der Anzahl an Erythrozyten und Thrombozyten. Eine Zunahme der Leukozyten (WBC) wurde bei den mit Ratten-IgG behandelten Rag1 defizienten Mäusen ($6,45 \pm 0,92 \times 10^3/\mu\text{l}$) verglichen mit anti-CD2 mAk behandelten Mäusen ($2,97 \pm 0,61 \times 10^3/\mu\text{l}$) beobachtet ($p < 0,01$; Abb. 4.9A).

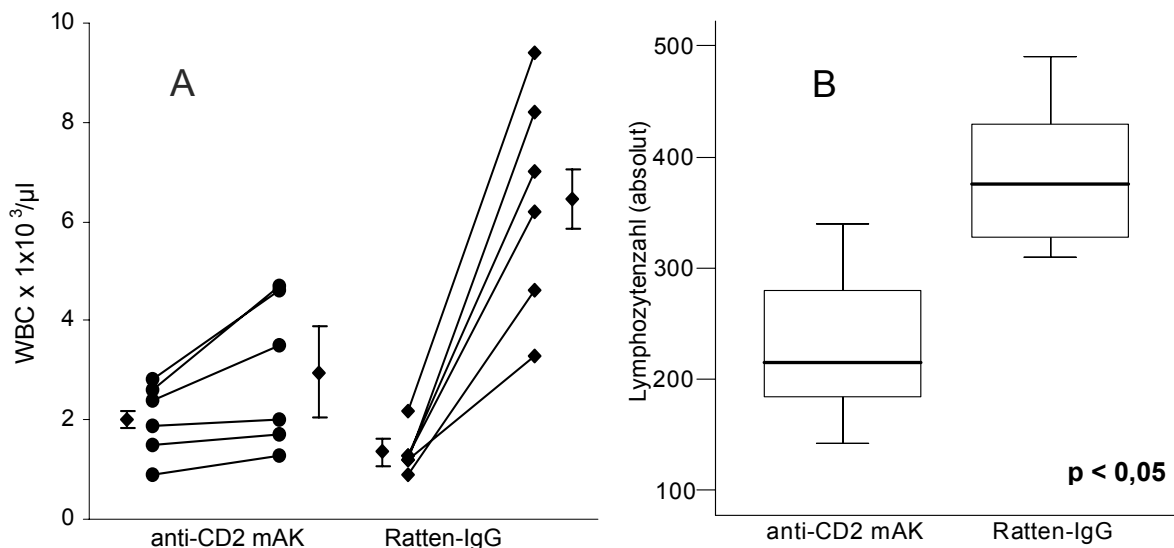


Abb. 4.9: Präventive Behandlung von Rag1 defizienten Transfercolitis-Mäusen mit anti-CD2 mAK führte bei einer generellen Leukozytose (A) auch zu einer Lymphozytose (B). Gezeigt sind der WBC von Tag 0 und zu Versuchsende (A) sowie die absoluten Lymphozytenzahlen zu Versuchsende (B).

Differentialblutbilder belegten, dass diese Leukozytose der Kontrolltiere mit signifikant höheren absoluten Lymphozytenwerten einhergingen (Kontroll-IgG: $386,6 \pm 33,1/\mu\text{l}$ vs. anti-CD2 mAk: $229,3 \pm 29,3/\mu\text{l}$, $p < 0,05$; Abb. 4.9B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch den präventiven Einsatz des anti-CD2 mAk 12-15 das Überleben nach einer durch CD4^+ T-Zellblasten induzierten Transfercolitis verlängert und der Verlauf dieser Erkrankung gemildert werden kann.

4.2.1.2 *Therapie etablierter T-Zellblasten-Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15 führt zu verlängertem Überleben*

Um in einem weiteren Schritt die therapeutische Wirkung des anti-CD2 mAk 12-15 zu überprüfen, wurde der Effekt dieses Antikörpers auf eine etablierte Colitis untersucht. Bei diesem Ansatz wurden ConA aktivierte CD4 positive T-Zellen auf Rag1 defiziente Mäuse transferiert und so eine Colitis induziert. Mit der Antikörper-Therapie wurde bei den ersten Krankheitssymptomen (Diarrhöe und/oder Gewichtsverlust), die in der Regel etwa 10-20 Tagen nach Transfer auftraten, begonnen. Die Behandlung der etablierten Colitis (Applikation: $400 \mu\text{g}$ an Tag 0 und nachfolgend wöchentlich $200 \mu\text{g}$) mit dem anti-CD2 mAk 12-15 verlängerte das Überleben signifikant (anti-CD2: $8,6 \pm 1,4$ Tage; Ratten-IgG: $5,8 \pm 0,7$; $p < 0,05$; Abb. 4.10).

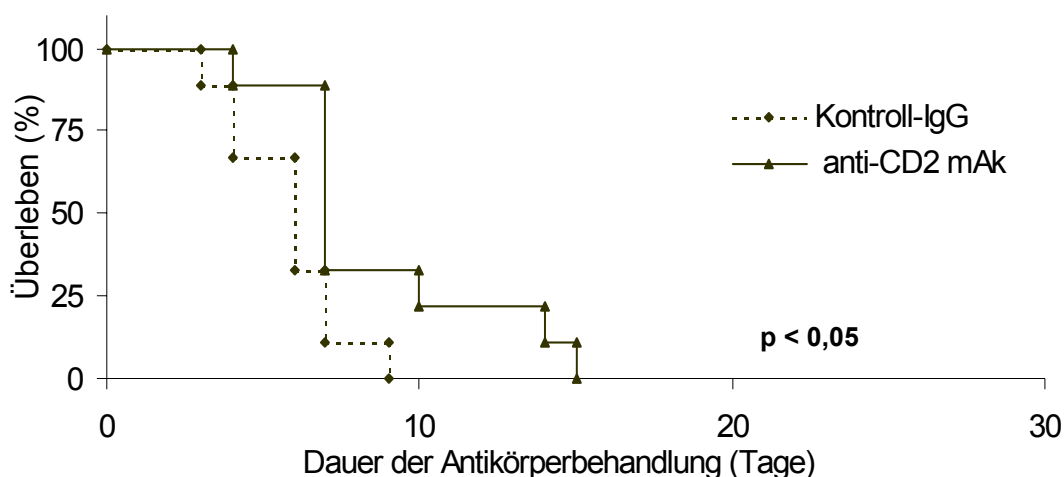


Abb. 4.10: Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Behandlung etablierter Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15. Zwar überlebten mit dem anti-CD2 mAk 12-15 behandelte Mäuse (—; $n = 9$) signifikant länger als die Tiere der Kontrollgruppe (···; $n = 9$), jedoch fanden sich in diesem Versuch keine langzeitüberlebenden Mäuse.

Langzeitüberlebende jedoch traten in dieser Gruppe der anti-CD2 mAk behandelten Mäuse nicht auf.

Mit dem Ziel, die Wirkung des anti-CD2 mAk 12-15 zu unterstützen, erfolgte in einem weiteren Versuchsansatz parallel zur Gabe der Antikörper die i. p. Applikation von Dexamethason (1 mg/kg), einem antiphlogistisch wirksamen Glukokortikoid. Die Tiere erhielten bei Auftreten der ersten Krankheitszeichen (Tag 0 der Antikörpertherapie) 400 µg anti-CD2 mAk 12-15 (n = 8) bzw. des Ratten-Kontroll-IgG (n = 8). An den Tagen 1, 4, und anschließend wöchentlich wurde den Mäusen je 200 µg der Antikörper in Kombination mit Dexamethason appliziert. Entsprechend behandelte Mäuse mit etablierter Colitis überlebten durchschnittlich mehr als doppelt so lang ($13,5 \pm 2,9$ Tage) wie die mit einer Kombination aus Dexamethason und Ratten-IgG behandelten Kontrollmäuse ($6,3 \pm 1,0$ Tage, $p < 0,05$; Abb. 4.11)

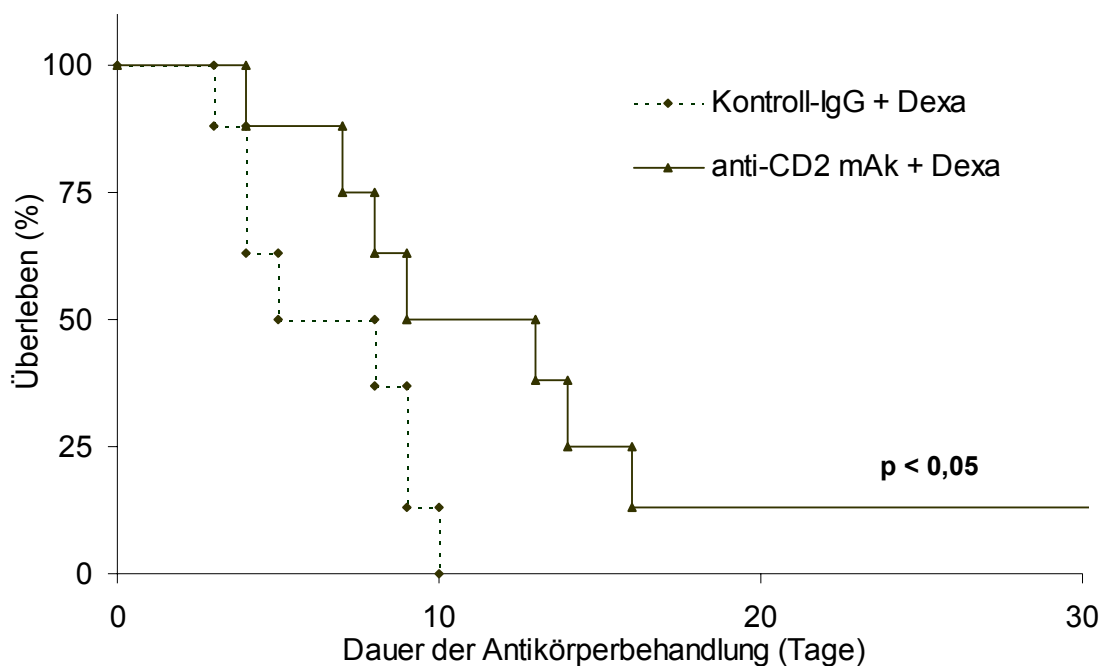


Abb. 4.11: Kaplan-Meier-Analyse des Überlebens bei etablierter Colitis und Kombinationstherapie mit Dexamethason (Dexa) und anti-CD2 mAk. Mit anti-CD2 mAk und Dexamethason behandelte Mäuse (—; n = 8) überlebten signifikant länger als mit Kontroll-IgG und Dexamethason behandelte Kontrollmäuse (···; n = 8).

Wichtig ist anzumerken, dass die Kombination von Dexamethason und Ratten-IgG im Vergleich mit Ratten-IgG allein zu keiner Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit führte (24,5 vs. 26 Tage).

Wurde der anti-CD2 mAk 12-15 mit Beginn der Krankheitszeichen verabreicht, konnte er weder alleine noch in Kombination mit Dexamethason die klinischen, histologischen oder systemischen (WBC, RBC, Thrombozyten) Zeichen der Transfercolitis signifikant abschwächen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Therapie etablierter Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15 zwar das Überleben verlängert wurde, es jedoch nicht möglich war, den letalen Verlauf der Erkrankung durch diese Behandlung zu verhindern.

4.2.1.3 *Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 verringert die IL-2 Produktion in CD3/CD28 stimulierten Lymphozyten*

Um die Mechanismen der CD2 gerichteten Therapie zu untersuchen, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss einer anti-CD2 gerichteten Therapie auf die Produktion verschiedener Th₁- (z.B. IL-2, IFN- γ , TNF- α) sowie Th₂- (z.B. IL-6, IL-10) Zytokine bestimmt.

Die Mäuse wurden am Versuchsende getötet, die Lymphozyten der Milz, der mesenterialen Lymphknoten (mLK) sowie der Lamina propria (LPL) wurden isoliert und mit anti-CD3/CD28 mAk stimuliert. Die Stimulation induzierte in allen Kulturen nach 48 Stunden im ELISA deutlich messbare IL-2 Produktion. Die IL-2 Sezernierung der LPL anti-CD2 behandelter Mäuse war verglichen mit jener Kontroll-IgG behandelter Mäuse jedoch signifikant reduziert (94 ± 40 pg/ml vs. 3066 ± 451 pg/ml; Abb. 4.12A, Prävention). Eine vergleichsweise verringerte IL-2 Produktion bei präventiver Gabe von 12-15 wurde ebenfalls bei Splenozyten (16 ± 3 pg/ml vs. 508 ± 111 pg/ml, Abb. 4.12B, Prävention) sowie bei mesenterialen Lymphknoten (20 ± 5 pg/ml vs. 402 ± 143 pg/ml, Abb. 4.12C, Prävention) anti-CD2-behandelter Mäuse gemessen.

Die Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und anti-CD2 mAk führte ebenfalls zu einer signifikant verminderten IL-2 Produktion in LPL (891 ± 103 vs. 2392 ± 508 pg/ml; Abb. 4.12A, etablierte Colitis) und zu einer nicht signifikant geringeren IL-2 Produktion von Splenozyten (217 ± 71 pg/ml vs. 982 ± 394 pg/ml; Abb. 4.12B, etablierte Colitis) sowie von Lymphozyten der mLK (239 ± 82 pg/ml vs. 609 ± 271 pg/ml; Abb. 4.12C, etablierte Colitis).

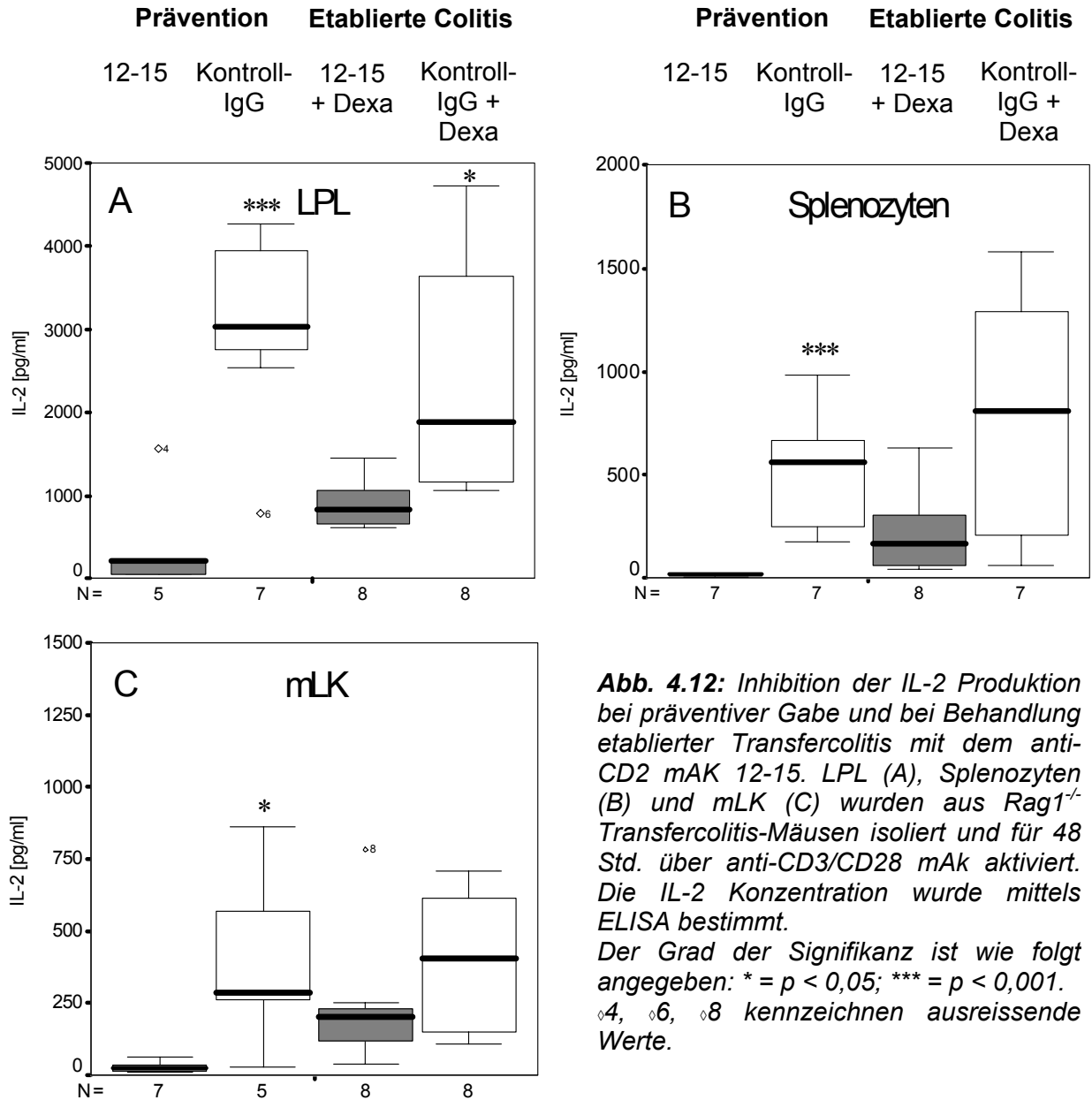


Abb. 4.12: Inhibition der IL-2 Produktion bei präventiver Gabe und bei Behandlung etablierter Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15. LPL (A), Splenozyten (B) und mLK (C) wurden aus *Rag1^{-/-}* Transfercolitis-Mäusen isoliert und für 48 Std. über anti-CD3/CD28 mAk aktiviert. Die IL-2 Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Der Grad der Signifikanz ist wie folgt angegeben: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$. ◊4, ◊6, ◊8 kennzeichnen ausreissende Werte.

Die alleinige Verabreichung von anti-CD2 mAk ohne Dexamethason konnte weder die IL-2 Produktion in LPL noch in Splenozyten oder Lymphozyten der mLK senken.

Hinsichtlich der Produktion anderer Zytokine wie IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α konnten in den drei Experimenten keine Unterschiede zwischen Zellen aus behandelten und unbehandelten Mäusen festgestellt werden. IL-4 konnte in keinem Überstand nachgewiesen werden.

4.2.1.4 *Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 senkt die Proliferation CD3/CD28 stimulierter Lymphozyten*

Zur Überprüfung, ob der präventive Einsatz des anti-CD2 mAk 12-15 einen Einfluss auf weitere T-Zellfunktionen hat, wurde die Proliferation von Splenozyten, Lymphozyten der mLK und der Lamina propria gemessen. Zu Ende der Behandlungsdauer wurden die Zellen aus den mit anti-CD2 mAk behandelten bzw. Kontrollmäusen isoliert, und über 72 Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk aktiviert. Die Proliferation wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen bestimmt.

T-Zellen aus der Milz und aus den mesenterialen Lymphknoten von 12-15 behandelten Tieren zeigten gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe eine signifikant geringere Proliferation (Abb. 4.13A: Prävention: Splenozyten, $p < 0,01$, Abb. 4.13B: mLK, $p < 0,05$) nach CD3/CD28-Stimulation.

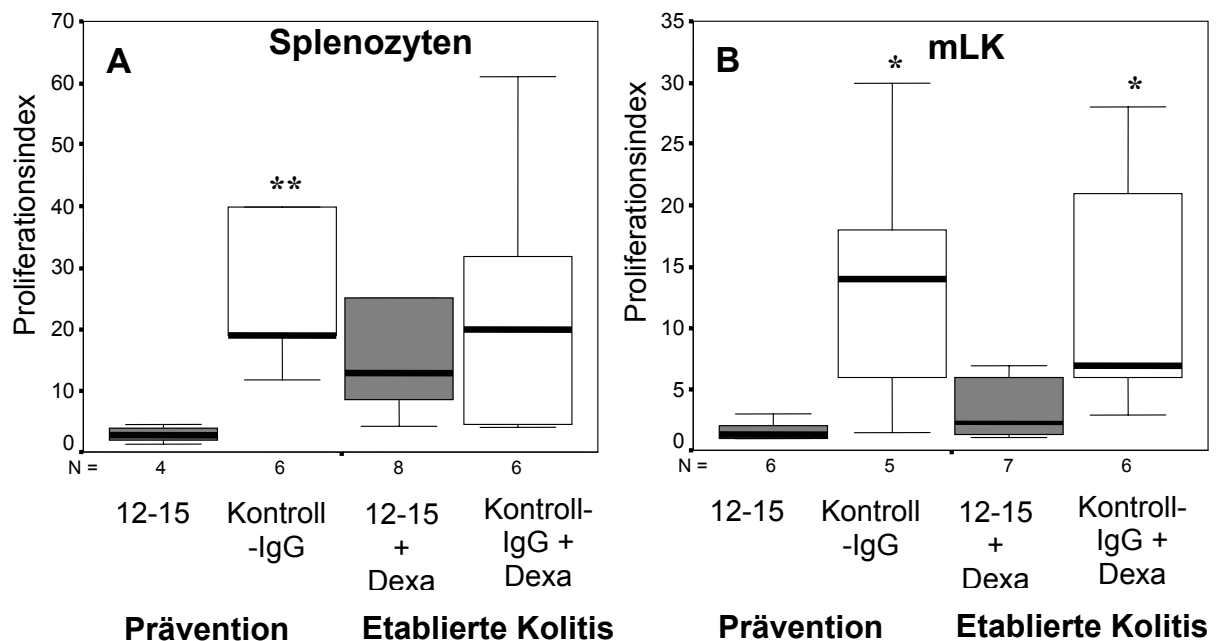


Abb. 4.13: Inhibition der Proliferation von Splenozyten (A) und Lymphozyten der mLK (B) nach CD3/CD28-Stimulation: Gezeigt sind sowohl die Ergebnisse nach präventiver Gabe als auch nach Behandlung etablierter Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15. Der Grad der Signifikanz ist wie folgt angegeben: * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$)

Des Weiteren wurde auch das Zellwachstum (nach Stimulation) von Lymphozyten aus Mäusen mit etablierter Colitis verglichen. Diese Vergleiche ergaben, dass Zellen aus Mäusen, die mit anti-CD2 mAk plus Dexamethason behandelt wurden, ebenfalls einen

geringeren Proliferationsindex aufwiesen, als jene Zellen, die aus Ratten-IgG plus Dexamethason behandelten Kontrollmäusen isoliert wurden.

Signifikante Unterschiede fanden sich hier jedoch nur bei Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten (Abb. 4.13B, mLK, etablierte Colitis, $p < 0,05$) und nicht bei denen der Milz (Abb. 4.13A, Splenozyten, etablierte Colitis). Zellen aus Mäusen mit etablierter Transfercolitis, die lediglich mit anti-CD2 mAk bzw. Kontroll-IgG behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu Zellen aus Kontrolltieren weder in Splenozyten, noch in Lymphozyten der mLK eine verringerte Proliferation auf.

Die proliferative Antwort der LPL war insgesamt zu gering für einen Vergleich.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass durch die Modulation von CD2 über den anti-CD2 mAk 12-15 die Proliferation der Lymphozyten stark gehemmt wurde.

4.2.2 *In vivo*-Versuche mit dem anti-CD2 mAk 12-15 bei CD45RB^{high}-Transfercolitis

4.2.2.1 *Die Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 beeinflusst Überleben und Gewichtsverlauf nach Transfer von CD45RB^{high}-T-Zellen nicht*

Um das präventive Potential des anti-CD2 mAk 12-15 in einem weiteren Modell der Transfercolitis zu testen, wurden CD45RB^{high}-exprimierende T-Zellen auf immundefiziente SCID Mäuse transferiert. Dieses Modell wird auch als klassisches Transfercolitismodell bezeichnet und unterscheidet sich von dem in den vorangegangenen Versuchen verwandten Modell durch einen milderen Verlauf sowie durch seine stärkere Abhängigkeit von regulatorischen T-Zellen.

Die Behandlung der Mäuse mit dem anti-CD2 mAk 12-15 ($n = 10$) bzw. mit Ratten-Kontroll-IgG ($n = 10$) wurde parallel zur Induktion der Colitis begonnen. Initial wurde den Mäusen 400 μg des Antikörpers i.p. verabreicht, nachfolgend wurden die Tiere einmal wöchentlich mit 200 μg der entsprechenden Antikörper behandelt.

Während dieser Zeit wurden die Tiere 3 x wöchentlich gewogen sowie klinisch hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes, des Auftretens von Diarrhöe und eines struppigen Fells beurteilt. Ab der 3. Woche nach Transfer wurde bei den Mäusen zusätzlich einmal wöchentlich eine Hämokkult-Bestimmung durchgeführt. Weiterhin wurden die Mäuse in der 6. Woche nach Transfer endoskopiert. Der Versuch wurde 8 Wochen nach Transfer beendet und alle Tiere wurden durch CO₂-Inhalation getötet.

Wie in Abb. 4.14 gezeigt unterschied sich der Gewichtsverlauf zwischen 12-15-behandelten bzw. Kontrolltieren im Versuchszeitraum nicht. Bei beiden Gruppen kam es anfangs zu einer leichten Steigerung des Gewichts, die mit Fortschritt der durch den Transfer ausgelösten Colitis (etwa ab 5. Woche nach Transfer) stagnierte, bzw. ab der 7. Woche bis auf das Ausgangsgewicht sank.

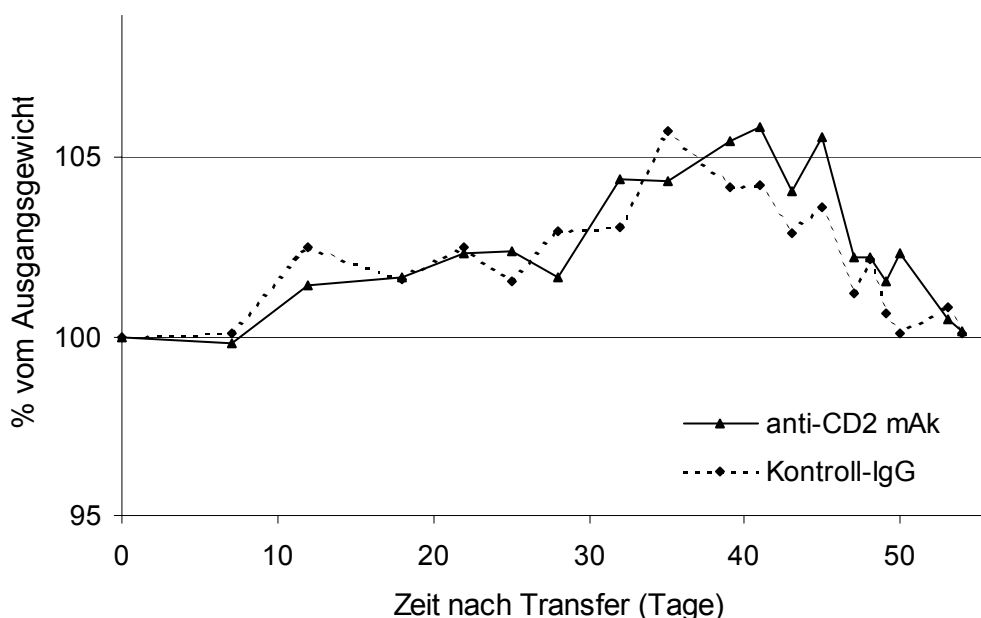


Abb. 4.14: Die Gabe des anti-CD2 mAk 12-15 beeinflusste das durchschnittliche Gewicht nach CD45RB_{high}-Transfercolitis nicht. Gezeigt ist der durchschnittliche Gewichtsverlauf nach der Induktion der Transfercolitis (Tag 0) in % vom Ausgangsgewicht. Es traten keine Unterschiede im Gewicht zwischen mit dem anti-CD2 mAk 12-15- (—) bzw. mit Kontroll-IgG behandelten Mäusen (---) auf.

Die makroskopische sowie mikroskopische Auswertung des Colons von anti-CD2-mAk bzw. Kontroll-IgG behandelten Mäusen ergab Unterschiede im Score (Abb. 4.15A: makroskopisch: $1,5 \pm 0,2$ vs. $2,0 \pm 0,2$; mikroskopisch: $2,3 \pm 0,5$ vs. $2,8 \pm 0,4$), die sich jedoch als statistisch nicht signifikant erwiesen.

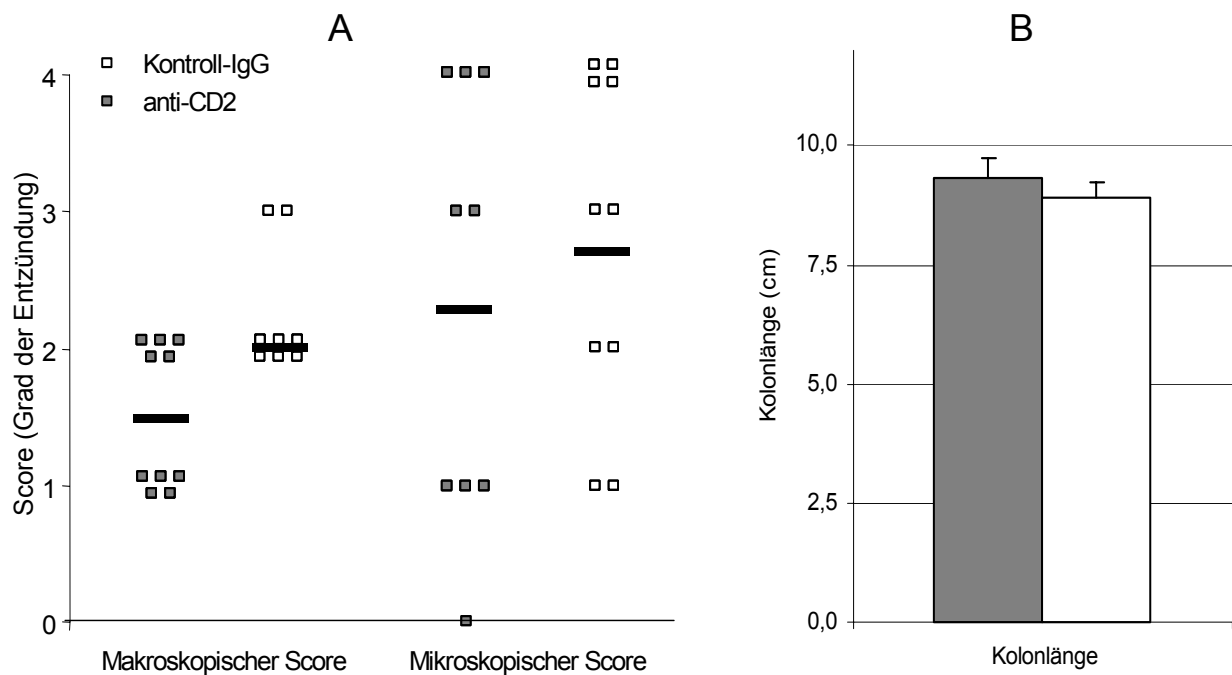


Abb. 4.15: Makroskopischer (A; linke Seite) und mikroskopischer Score (A; rechte Seite) sowie Colonlänge (B) anti-CD2-behandelter bzw. Kontroll-IgG behandelter SCID-Mäuse 8 Wochen nach Transfer von CD45RB^{high}-Zellen.

Auch die durchschnittliche Colonlänge von Versuchs- ($9,3 \pm 0,5$ cm) und Kontrollmäusen ($8,9 \pm 0,3$ cm) unterschied sich ebenfalls nicht (Abb.15B).

Auch die Analysen des Blutes zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Hämoglobingehaltes oder der Anzahl an Erythrozyten und Thrombozyten. Nachgewiesen wurden allerdings höhere Leukozytenwerte ($8,47 \pm 1,53 \times 10^3/\mu\text{l}$ vs. $6,23 \pm 1,63 \times 10^3/\mu\text{l}$) bei den mit Kontroll-IgG behandelten SCID-Mäusen. Die Unterschiede waren jedoch, anders als bei der ConA aktivierten T-Zellblasten-Transfercolitis, statistisch nicht signifikant ($p = 0,1$).

Die Auswertung der Differentialblutbilder belegte, dass die Absolutzahl an Lymphozyten bei Kontrollmäusen ($2446 \pm 436/\mu\text{l}$) zu Versuchsende signifikant höher war als bei anti-CD2 mAk behandelten ($696 \pm 148/\mu\text{l}$) Mäusen (Abb. 4.16; $p < 0,001$).

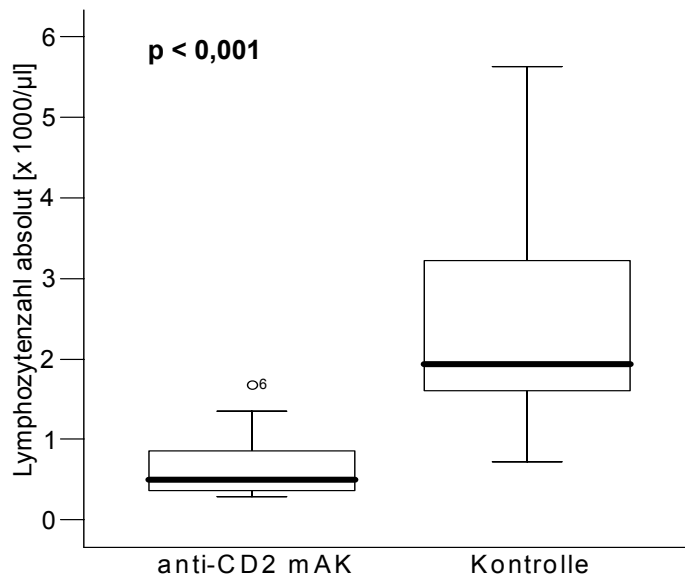


Abb. 4.16: Therapie von $CD45RB^{high}$ induzierter Transfercolitis mit anti-CD2 mAk führte zu einer verringerten Lymphozytose verglichen mit Ratten-IgG behandelten Kontrollmäusen. Gezeigt ist die Lymphozyten-Absolutzahl zu Versuchsende.

Bei den mit anti-CD2 mAk behandelten Tieren unterschied sich die Absolutzahl der Lymphozyten zu Versuchsende nicht signifikant von der zu Versuchsbeginn. Somit zeigte sich *in vivo* das Korrelat zur *in vitro* bereits nachgewiesenen anti-CD2 vermittelten Proliferationshemmung. Diese spiegelte sich jedoch nicht signifikant in makroskopischem oder mikroskopischem Score bzw. der Colonlänge wider. Damit ist eine Verbesserung einer über $CD45RB^{high}$ -T-Zellen induzierten Transfercolitis 8 Wochen nach Induktion nicht nachweisbar.

4.2.2.2 *Der anti-CD2 mAk 12-15 verzögert den Verlauf einer klassischen $CD45RB^{high}$ -Transfercolitis*

Trotz der geringen, nicht signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe zu Versuchsende gab es zwischen beiden Gruppen signifikante Unterschiede im Verlauf der Colitis.

Der ab der 3. Woche nach Transfer wöchentlich durchgeführte Test auf okkultes Blut (Hämokkult) zeigte das wesentlich frühere Auftreten klinischer Zeichen von Entzündung bei den Kontrolltieren im Vergleich zu den mit anti-CD2 mAk behandelten Versuchstieren (siehe Abb. 4.17). Während 3 Wochen nach Transfer bereits 60% der mit Ratten-IgG behandelten Mäuse Hämokkult positiv waren, konnte in der Versuchsgruppe lediglich bei 10% der Tiere Blut im Stuhl nachgewiesen werden.

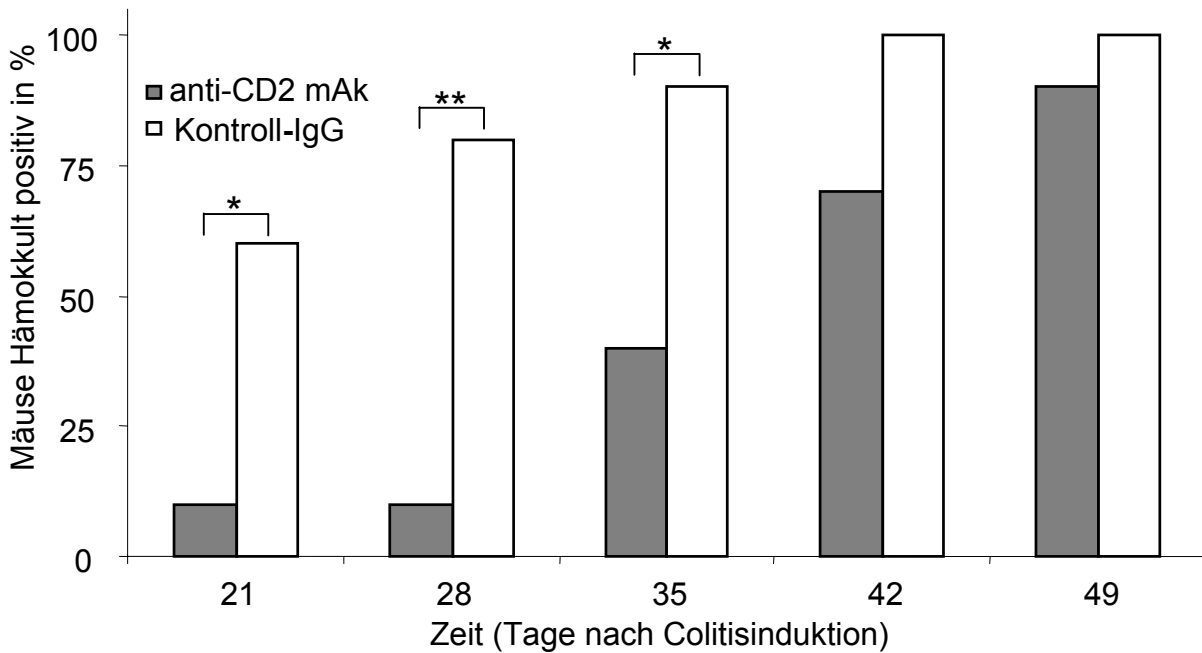


Abb. 4.17: Ein wöchentlicher Test auf okkultes Blut im Stuhl ab der 3. Woche nach Transfer bewies einen früheren Beginn der Colitis bei den Kontrollmäusen. Grau: anti-CD2 mAk behandelte Tiere, weiß: Ratten-IgG behandelte Kontrollmäuse. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Ähnlich starke Unterschiede konnten auch in den Wochen 4 und 5 nach Transfer beobachtet werden. Da ab der 6. Woche nach Transfer die Mehrzahl aller im Versuch eingeschlossenen Mäuse Blut im Stuhl aufwies, war ab diesem Zeitpunkt eine klinische Beurteilung der Mäuse über den Hämokkult Test nicht mehr möglich.

Daher wurden die Mäuse sechs Wochen nach Induktion der Transfercolitis endoskopiert. Die geblindete Auswertung durch einen erfahrenen Gastroenterologen ergab signifikante Unterschiede im Grad der Entzündung bei den anti-CD2 mAk- verglichen mit den Ratten-IgG behandelten Mäusen (siehe Abb. 4.18; A-D: endoskopische Aufnahme, E: Boxplot des endoskopischen Score). Die anti-CD2 behandelten Mäuse wiesen eine signifikant geringere Anzahl von Erythemen sowie Ödemen auf und zeigten eine meist normale bis nur gering verminderte Vaskularität. Ulzerationen oder eine Aufhebung der Vaskularität fanden sich in der behandelten Gruppe nicht. Im Gegensatz dazu konnten Ulzerationen und eine aufgehobene Gefäßzeichnung in der Kontrollgruppe beobachtet werden.

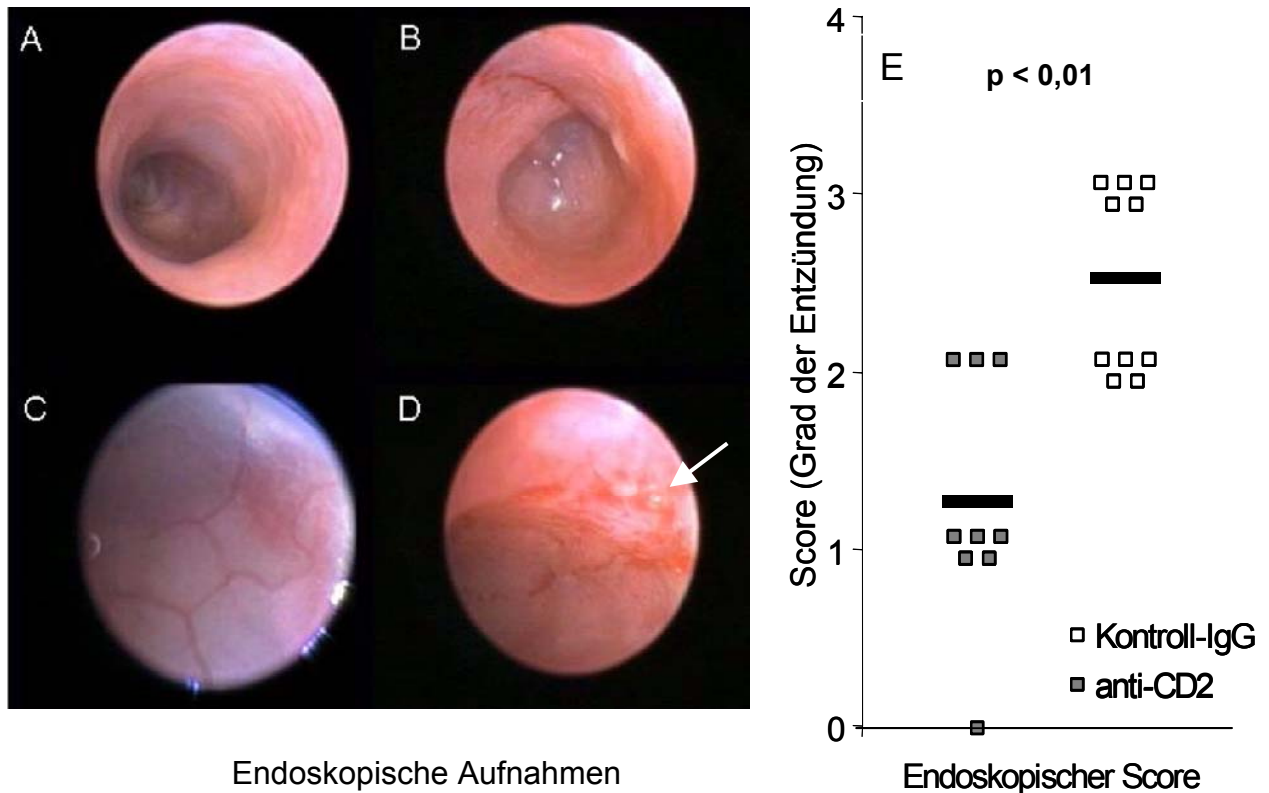


Abb. 4.18: Eine 6 Wochen nach Transfer geringer ausgeprägte Colitis konnte durch eine Koloskopie der Mäuse nachgewiesen werden. Die Abbildungen A-D zeigen endoskopische Aufnahmen des Colons einer Maus, die mit anti-CD2-mAk behandelt wurde (A, C), bzw. das einer mit Ratten-IgG behandelten Kontrollmaus (B, C). In dem Boxplot (E) wird der zu diesem Zeitpunkt bei den Mäusen vergebene endoskopische Score dargestellt. Dieser unterschied sich signifikant zwischen Versuchs- und Kontrolltieren (anti-CD2 mAk 12-15 behandelt: $1,22 \pm 0,2$ vs. Kontrolltiere: $2,5 \pm 0,2$; $p < 0,01$). Pfeil: Ulzeration

Insgesamt konnte somit durch die Therapie mit dem anti-CD2 mAk 12-15 eine durch Transfer von CD45RB^{high} T-Zellen induzierte klassische Transfercolitis nicht verhindert, ihr Verlauf jedoch verzögert werden.

4.2.3 *Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 verringert die Produktion von Th₁- und Th₂-Zytokinen in stimulierten Lymphozyten*

Auch in diesem klassischen Transfercolitismodell wurde die Wirkung einer gegen CD2 gerichteten Therapie auf die Zytokinproduktion untersucht. Hierzu wurden zu Versuchs-ende Lymphozyten der Milz, der mesenterialen Lymphknoten sowie der Lamina propria isoliert und *in vitro* mit anti-CD3/CD28 mAk stimuliert. Nach 48 Stunden wurde mittels ELISA im Überstand der einzelnen Proben die Konzentrationen verschiedener Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α) bestimmt. Eine verringerte Produktion von IL-2 wurde bei stimulierten Splenozyten (Abb. 4.19A links: 146 ± 43 vs. 1778 ± 484 pg/ml) und LPL (Abb. 4.19A; rechts: 104 ± 41 vs. 2032 ± 501 pg/ml) anti-CD2-behandelter

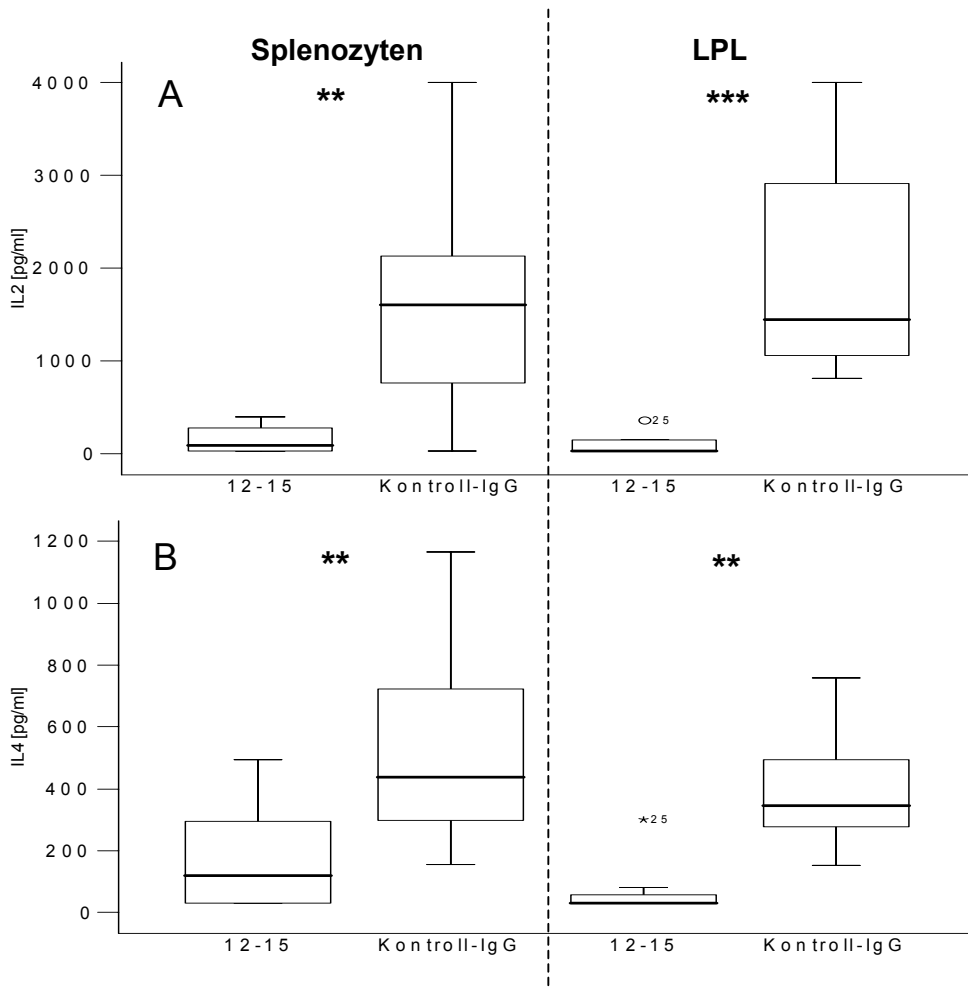


Abb. 4.19: *In vitro* Produktion von IL-2 und IL-4 durch Splenozyten und LPL nach Stimulation über CD3 und CD28. Nach 48 Stunden wurden die Zytokin-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Die vorangegangene *in vivo*-Behandlung der klassischen Transfercolitis mit dem anti-CD2 mAk 12-15 hemmte die IL-2 (A) und IL-4 Produktion in Splenozyten (links) und LPL (rechts). Der Grad der Signifikanz ist wie folgt angegeben: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Mäuse gemessen. Stimulierte Zellen dieser Mäuse produzierten ebenfalls geringere Spiegel von IL-4 (Abb. 4.19B; links Splenozyten: 170 ± 51 vs. 538 ± 114 pg/ml; rechts LPL: 72 ± 33 vs. 400 ± 77 pg/ml). Auch die Spiegel an IL-6, die Splenozyten von Mäusen der Versuchsgruppe sezernierten, war signifikant geringer (1636 ± 308) als die der Kontrollgruppe (2840 ± 361 pg/ml; $p < 0,05$). Ebenso die IFN- γ Produktion ($21,4 \pm 5,6$ vs. $46,5 \pm 9,3$ ng/ml; $p < 0,05$). Die Sekretion von IL-10 und TNF- α war bei stimulierten LPL anti-CD2 mAk behandelter Mäuse signifikant niedriger als bei den Kontrollmäusen (IL-10: 397 ± 127 vs. 726 ± 108 pg/ml; $p < 0,05$; TNF- α : 28 ± 8 vs. 140 ± 42 pg/ml; $p < 0,01$).

Hinsichtlich der Zytokinproduktion durch stimulierte Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten konnte lediglich der Trend zur verminderten IL-2 Synthese ($p = 0,08$) nachgewiesen werden. Keine Unterschiede wurden bei der Sekretion von IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α festgestellt. Tab. 4.1 fasst die Ergebnisse der Zytokinmessung schematisch zusammen.

Tab. 4.1: Zytokinprofil von stimulierten Lymphozyten anti-CD2 behandelter Mäuse 8 Wochen nach Transfer von CD45RB^{high} T-Zellen. Dargestellt ist die Sekretion der jeweiligen Zytokine im Vergleich zu der von Ratten-IgG behandelten Kontrollmäusen zum selben Zeitpunkt.

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	IFN- γ
Splenozyten	↓	↓	↓	-	-	↓
LPL	↓	↓	-	↓	↓	-
Lymphozyten der mLK	(↓)	-	-	-	-	-

(nicht signifikant verminderte Sekretion: (↓); signifikant verminderte Sekretion: ↓; signifikant erhöhte Sekretion: ↑; keine Unterschiede: -)

Insgesamt produzierten somit stimulierte Lymphozyten anti-CD2 mAk behandelter Mäuse weniger Zytokine.

4.2.2.4 *Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 senkt die Proliferation stimulierter Splenozyten und LPL*

Um den Einfluss eines präventiven Einsatzes des anti-CD2 mAk 12-15 auf die T-Zellfunktionen zu überprüfen, wurde die Proliferation von Splenozyten, sowie die von Lymphozyten der mLK und der Lamina propria gemessen. Die Zellen wurden zu Versuchsende isoliert und für 72 Stunden über CD3 und CD28 aktiviert. Die Proliferation wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen bestimmt.

T-Zellen der Milz (Abb. 4.20A: Splenozyten, PI: $0,94 \pm 0,2$ vs. $7,05 \pm 2,1$) und der Lamina propria (Abb. 4.20B: LPL, PI: $2,5 \pm 1,1$ vs. $12,05 \pm 4,0$) von anti-CD2 mAk behandelten Tieren zeigten nach CD3/CD28-Stimulation gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant geringere Proliferation. Bei der proliferativen Antwort von Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten (Abb 4.20C: mLK: $15,1 \pm 8,1$ vs. $12,3 \pm 4,0$) dagegen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

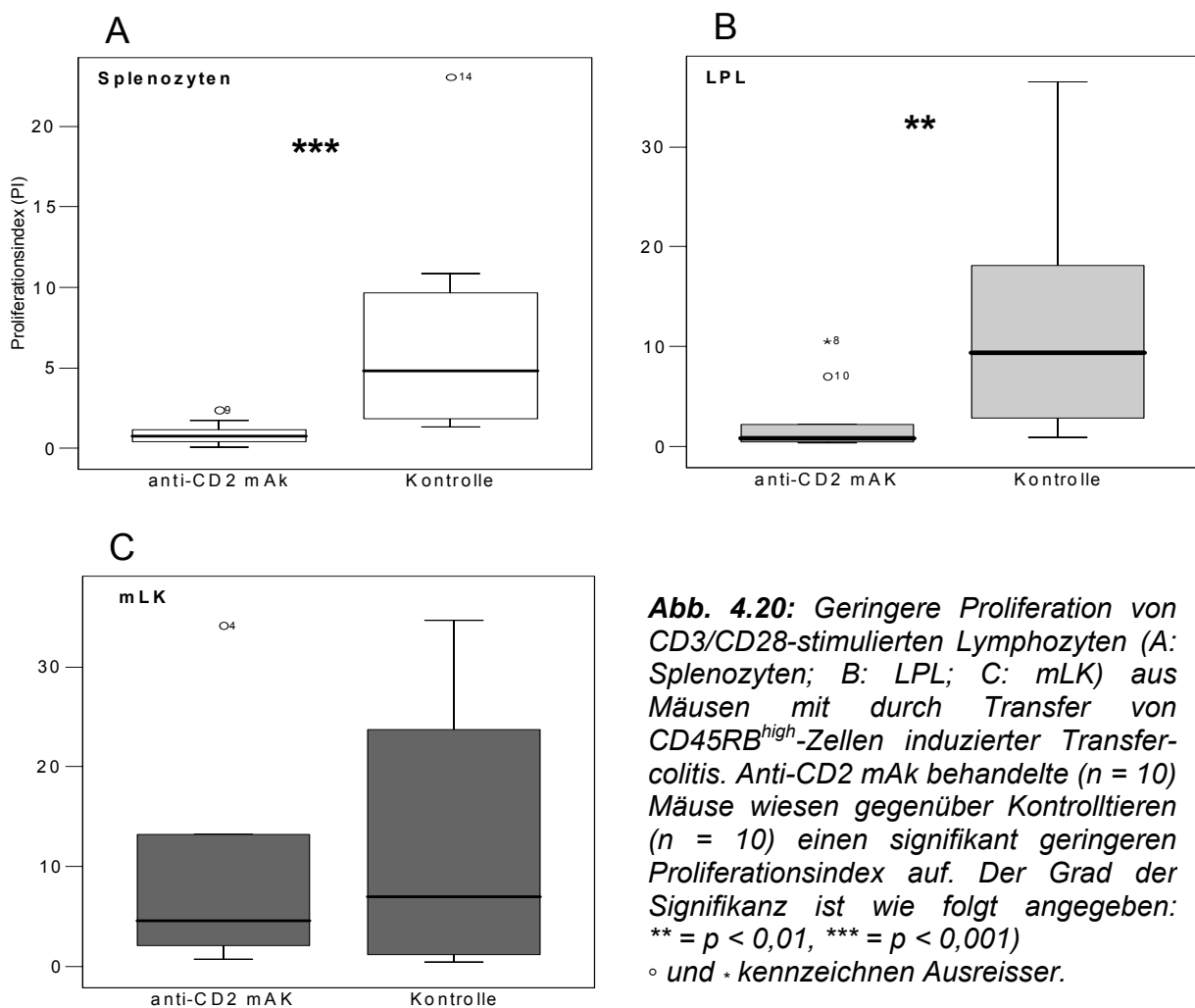


Abb. 4.20: Geringere Proliferation von CD3/CD28-stimulierten Lymphozyten (A: Splenozyten; B: LPL; C: mLK) aus Mäusen mit durch Transfer von CD45RB^{high}-Zellen induzierter Transfercolitis. Anti-CD2 mAk behandelte (n = 10) Mäuse wiesen gegenüber Kontrolltieren (n = 10) einen signifikant geringeren Proliferationsindex auf. Der Grad der Signifikanz ist wie folgt angegeben: ** = p < 0,01, *** = p < 0,001) ○ und * kennzeichnen Ausreisser.

Auffallend in diesem Versuch ist die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der T-Zellblasten induzierten Transfercolitis und den *in vitro*-Untersuchungen. Alle drei Versuche beschreiben die generelle Hemmung der Proliferation von Lymphozyten, die über den anti-CD2 mAk 12-15 moduliert wurden.

4.2.2.5 *Keine Induktion von regulatorischen T-Zellen durch Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15*

Um die Induktion regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) durch den anti-CD2 mAk zu überprüfen, wurde durchflußzytometrisch die CD4/CD25-Expression von Splenozyten (unstimuliert/stimuliert), mLK (stimuliert) und LPL (unstimuliert/stimuliert), sowie die intrazelluläre IL-10 Produktion von Splenozyten bestimmt. Es konnten dabei weder in stimulierten Splenozyten, Lymphozyten der mLK und Lamina propria, noch in unstimulierten LPL Unterschiede in der CD4/CD25-Expression von anti-CD2 mAk behandelten Versuchs- vs. Ratten-IgG behandelten Kontrolltieren festgestellt werden. Unstimulierte Splenozyten der Kontrollmäuse wiesen sogar einen signifikant höheren Prozentsatz CD4/CD25 positiver Zellen auf ($6,0 \pm 1,7\%$ vs. $1,8 \pm 0,5\%$; $p < 0,05$).

Auffällig ist auch die höhere Zahl CD4 positiver unstimulierter ($23,3 \pm 7,8\%$ vs. $6,9 \pm 1,7\%$; $p < 0,05$) und stimulierter Splenozyten ($29,7 \pm 4,9\%$ vs. $15,7 \pm 3,8\%$; $p < 0,05$) sowie stimulierter Lymphozyten der mLK ($73,7 \pm 2,9\%$ vs. $50,7 \pm 5,5\%$; $p < 0,05$) von Ratten-IgG behandelten Kontrollmäusen. Die niedrigere Anzahl CD4 positiver Zellen bei den anti-CD2 mAk behandelten Mäusen spiegelt vermutlich die durch den Antikörper induzierte Proliferationshemmung wieder. Sie findet sich jedoch nicht beim Vergleich von LPL aus anti-CD2 mAk vs. Ratten-IgG behandelten Mäusen.

Des Weiteren erfolgte an restimulierten Splenozyten die Messung von intrazellulärem IL-10. Hierfür wurden die Zellen für 5 Tage mit ConA stimuliert und anschließend für 6 h mit PMA/Iono restimuliert. Die Zellen wurden fixiert und auf CD4, CD25 und IL-10 gefärbt. Die Synthese von intrazellulärem IL-10 wurde durch die Behandlung mit dem anti-CD2 mAk nicht erhöht ($1,19 \pm 0,29$ pg/ml vs. $1,15 \pm 0,53$ pg/ml; $p = 0,48$).

Zusammengefasst ergibt sich, dass ein Effekt des anti-CD2 mAk 12-15 auf Grund einer Induktion von regulatorischen T-Zellen unwahrscheinlich ist.

4.2.3 Einfluss von CD2 auf eine Infektion mit *T. gondii*

Nachdem das therapeutische Potential des anti-CD2 mAk in zwei Colitismodellen nachgewiesen werden konnte, war es von wesentlicher Bedeutung, auch die Möglichkeit unerwünschter Effekte einer CD2-Modulation zu untersuchen. Hierzu wurde das Modell der Toxoplasmen-Infektion gewählt. Dieses Modell wird einerseits als Infektionsmodell genutzt, andererseits zeigt es aufgrund seiner Immunpathologie Ähnlichkeiten zum Morbus Crohn. Um die Gefahr einer unspezifischen Immunsuppression als unerwünschte Nebenwirkung einer CD2-Behandlung zu überprüfen, wurde der Einfluss einer anti-CD2 gerichteten Therapie auf eine Infektion mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) untersucht. Weiterhin wurden CD2 defiziente Mäuse mit *T. gondii* infiziert, um neben der Bedeutung von CD2 für die Infektabwehr auch Erkenntnisse über seine Bedeutung bei der Toxoplasmen-induzierten Crohnpathologie zu gewinnen.

4.2.3.1 *Die Modulation von CD2 hat keine immunsuppressiven Effekte auf die Kontrolle einer murinen T. gondii-Infektion*

Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine anti-CD2 gerichtete Antikörpertherapie auf die Abwehr von *T. gondii* hat, wurden C57BL/6 Mäuse über eine Sonde peroral mit *T. gondii* infiziert und über 7 Tage mit dem anti-CD2 mAk 12-15 (n = 15) bzw. mit Kontroll-IgG (n = 8) behandelt. Ein Teil der Tiere wurde an Tag 12 getötet und es wurde die Zahl der Parasiten pro cm Ileum bestimmt. Die verbleibenden Tiere dienten zur Erstellung einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier.

Die Auswertung der immunhistologischen Präparate ergab, dass die Anzahl der Parasiten durch die Gabe des CD2 mAk 12-15 nicht verändert wurde (anti-CD2 mAk behandelte Mäuse (n = 12): 334 ± 161 ; Kontrollgruppe (n = 4): 274 ± 69 ; siehe Abb. 4.21).

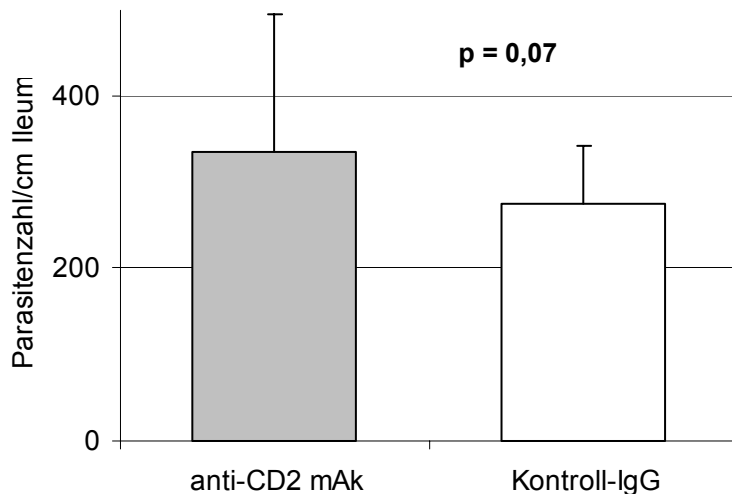


Abb. 4.21: Therapie mit dem anti-CD2 mAk 12-15 führte verglichen mit der Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Änderung der Zahl von Parasiten pro cm Ileum.

Somit kann ein negativer Effekt einer CD2-gerichteten Therapie zumindest auf die Abwehr von *T. gondii* ausgeschlossen werden.

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse eine (nicht signifikante) Tendenz dahin, dass die Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 ($n = 7$) zu einem verlängerten Überleben im Vergleich zu den Kontrolltieren ($n = 4$) führte ($p = 0,1$; nicht gezeigt).

4.2.3.2 *Eine CD2-Defizienz hat positive Effekte auf ein durch *T. gondii* induziertes Crohn-Modell*

Im vorangegangenen Versuch (4.2.3.1) konnte nicht nur nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 bei einer Toxoplasmen-Infektion nicht mit einem höheren Parasitentiter einhergeht, sondern im Trend sogar ein eher längeres Überleben der infizierten Mäuse bewirkte. Darauf aufbauend sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden, wie sich ein Fehlen von CD2 auf eine solche Toxoplasmen-Infektion auswirkt. Daher wurden analog zu den vorangegangenen Versuchen Mäuse auf einem C57BL/6-Hintergrund (16 CD2 defiziente Mäuse und 10 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse) peroral mit 100 Zysten des Toxoplasmen-Stamm ME49 infiziert. Wiederum sollte zum einen die Kontrolle der Parasiten untersucht werden, zum anderen sollten auch Aussagen zur Immunpathogenese sowie zum Überleben der infizierten, CD2 defizienten Mäuse getroffen werden.

Innerhalb der ersten Tage nach Infektion verloren sowohl die Wildtyp- (WT-) Mäuse als auch die CD2 defizienten Tiere stark an Gewicht. An Tag 7 wiesen die CD2 defizienten Mäuse im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen jedoch einen signifikant geringeren Gewichtsverlust auf (Abb. 4.22).

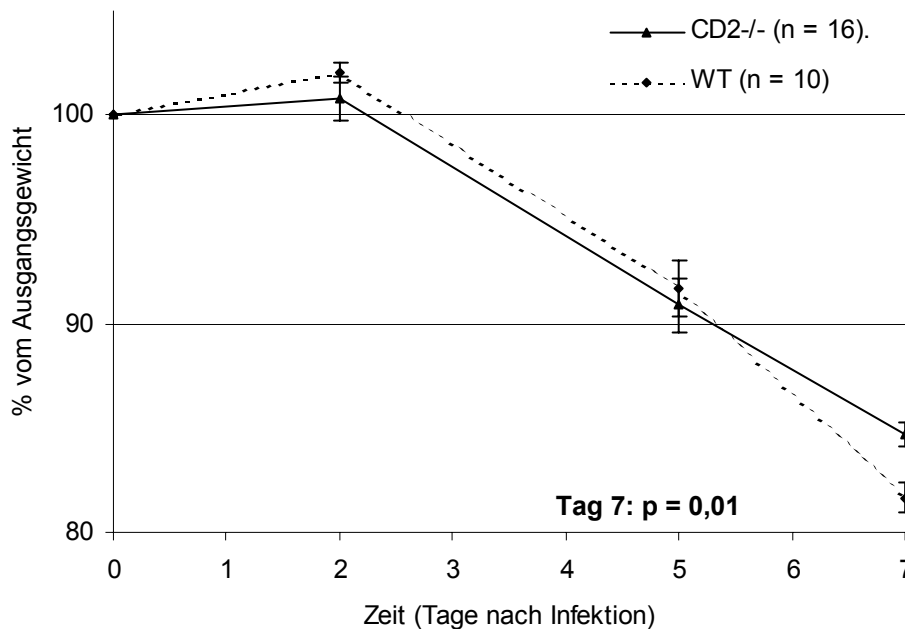


Abb. 4.22: Gewichtsverlauf von WT ($n = 10$) vs. CD2 defizienten Mäusen ($n = 16$) innerhalb der ersten Woche nach peroraler Infektion mit *T. gondii*. Nach 7 Tagen haben die CD2 defizienten Mäuse signifikant weniger an Gewicht verloren als die WT-Mäuse.

Auf Grund massiver Krankheitssymptome wurden alle WT-Tiere 7-8 Tage nach der Infektion getötet. Acht der 16 zu diesem Zeitpunkt klinisch wesentlich weniger beeinträchtigten CD2 defizienten Mäuse wurden ebenfalls 7-8 Tage nach Infektion getötet. Von den Tieren dieser beiden Gruppen wurden Zytokinprofile vom Serum und dem Überstand unstimulierter, sowie über CD3/CD28 bzw. Toxoplasmenlysate (TLA) stimulierter Splenozyten und Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten erstellt. Die Proliferation dieser Zellen wurde ebenfalls über den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Analog zu Versuch 4.2.3.1 wurde die Zahl der Parasiten pro cm Ileum ermittelt und zusätzlich wurde bei diesen Tieren die nekrotische Fläche des Ileums beurteilt. Von den verbleibenden CD2 defizienten Tieren wurde nach Kaplan-Meier eine Überlebenskurve erstellt.

Die Messungen der Zytokine ergaben eine signifikant geringere Produktion von IFN- γ im Serum ($7,9 \pm 1,2$ ng/ml vs. $13,7 \pm 1,8$ ng/ml, Abb. 4.23A), sowie im Überstand TLA-stimulierter Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten CD2 defizienter Mäuse ($22,9 \pm 14,0$ ng/ml vs. $82,4 \pm 26,2$ ng/ml, Abb. 4.23B).

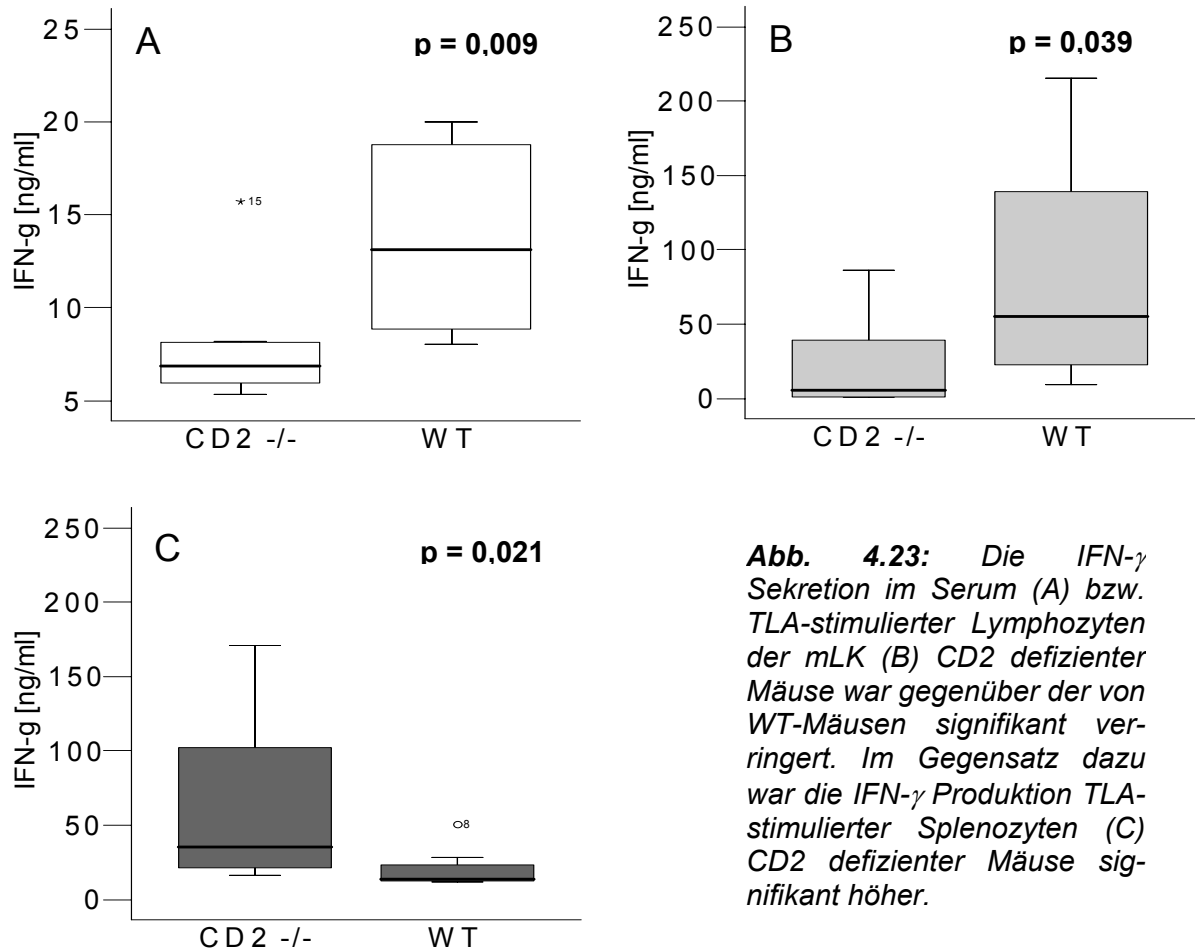


Abb. 4.23: Die IFN- γ Sekretion im Serum (A) bzw. TLA-stimulierter Lymphozyten der mLK (B) CD2 defizienter Mäuse war gegenüber der von WT-Mäusen signifikant verringert. Im Gegensatz dazu war die IFN- γ Produktion TLA-stimulierter Splenozyten (C) CD2 defizienter Mäuse signifikant höher.

Erstaunlicherweise waren die IFN- γ Spiegel TLA-stimulierter Splenozyten CD2 defizienter Mäuse signifikant höher als die der WT-Mäuse ($63,2 \pm 20,0$ ng/ml vs. $20,2 \pm 4,8$ ng/ml; Abb 4.23C).

Außerdem war die IL-6 Produktion sowohl von TLA- ($73,2 \pm 18,4$ pg/ml vs. $193,5 \pm 47,8$ pg/ml; Abb 4.24A) als auch die von CD3/CD28 ($98,2 \pm 19,2$ pg/ml vs. $359,9 \pm 63,0$ pg/ml; Abb 4.24B) stimulierten Lymphozyten der mLK CD2 defizienter Mäuse signifikant niedriger als die IL-6 Produktion entsprechender Zellen von WT-Mäusen.

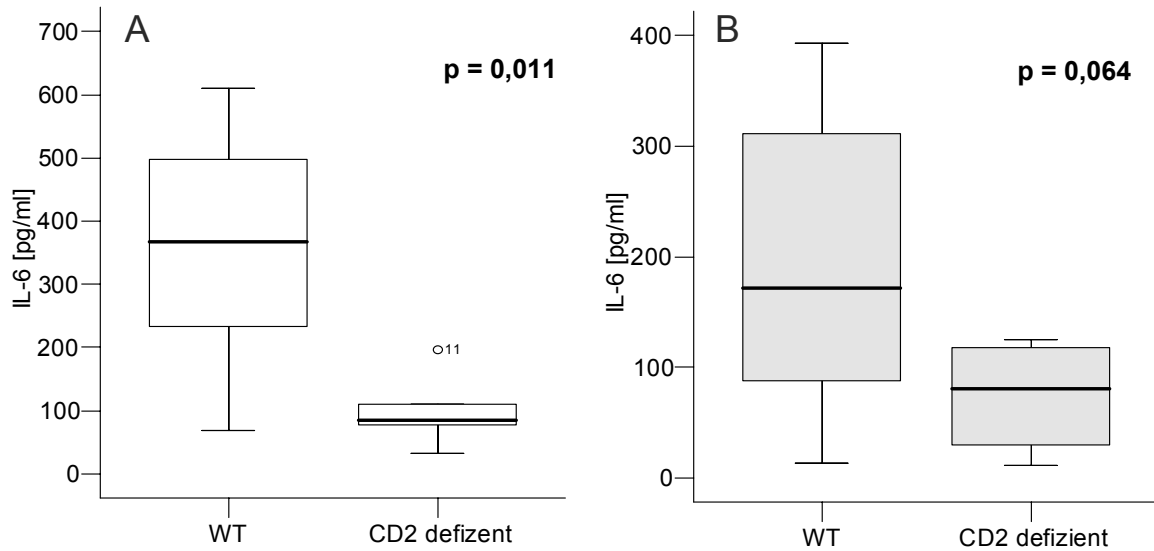


Abb. 4.24: Stimulierte Lymphozyten der mLK (A: CD3/CD28 stimuliert; B: TLA-stimuliert) CD2 defizienter Mäuse ($n = 8$) wiesen verglichen mit denen von WT-Mäusen ($n = 8$) eine signifikant verminderte IL-6 Produktion auf.

Weitere signifikante Unterschiede hinsichtlich der Produktion von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α oder TGF- β fanden sich bei der vergleichenden Analyse der Zytokinprofile von infizierten WT- vs. CD2 defizienten Mäusen nicht.

Die histologischen Untersuchungen des Ileums belegten weiterhin eine signifikant höhere Zahl an *T. gondii*-Vakuolen (349 ± 58 vs. 88 ± 12 ; $p < 0,01$) im Darm infizierter WT-Mäuse verglichen mit CD2 defizienten Mäusen (Abb. 4.25).

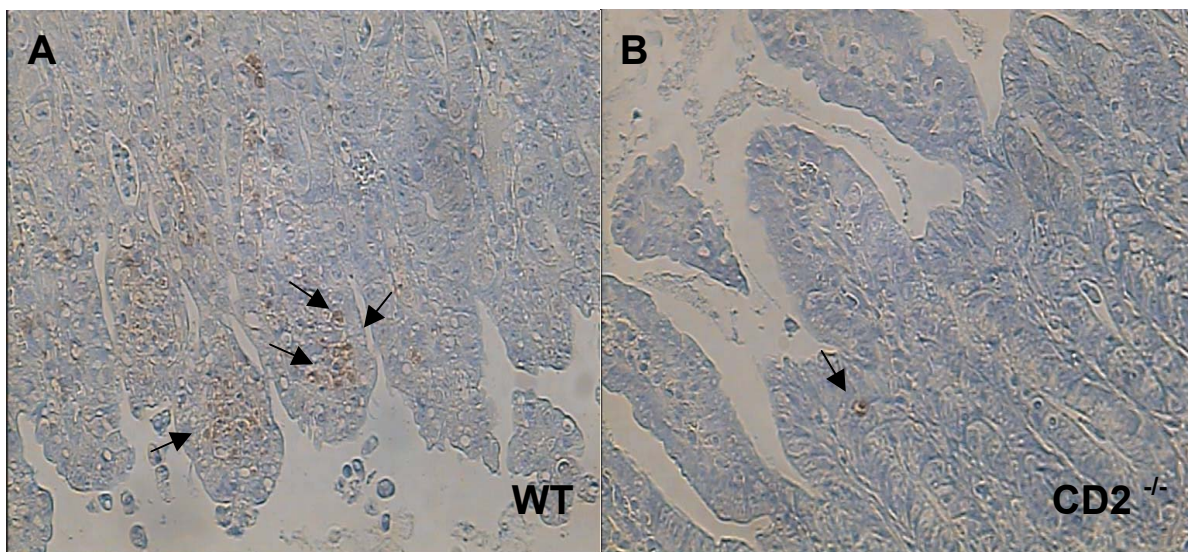


Abb. 4.25: Das mit Immunperoxidase gefärbte Ileum *T. gondii* infizierter WT-Mäuse (A) weist signifikant mehr Vakuolen auf als das infizierter, CD2 defizienter Mäuse (B). Pfeile markieren einige der Vakuolen.

Die Auswertung von HE-gefärbten Schnitte des Ileums ergab eine ebenfalls signifikant geringere Entzündung im Darm CD2 defizienter verglichen mit WT-Mäusen ($2,3 \pm 0,2$ vs. $4,3 \pm 0,4$; Abb. 4.26)

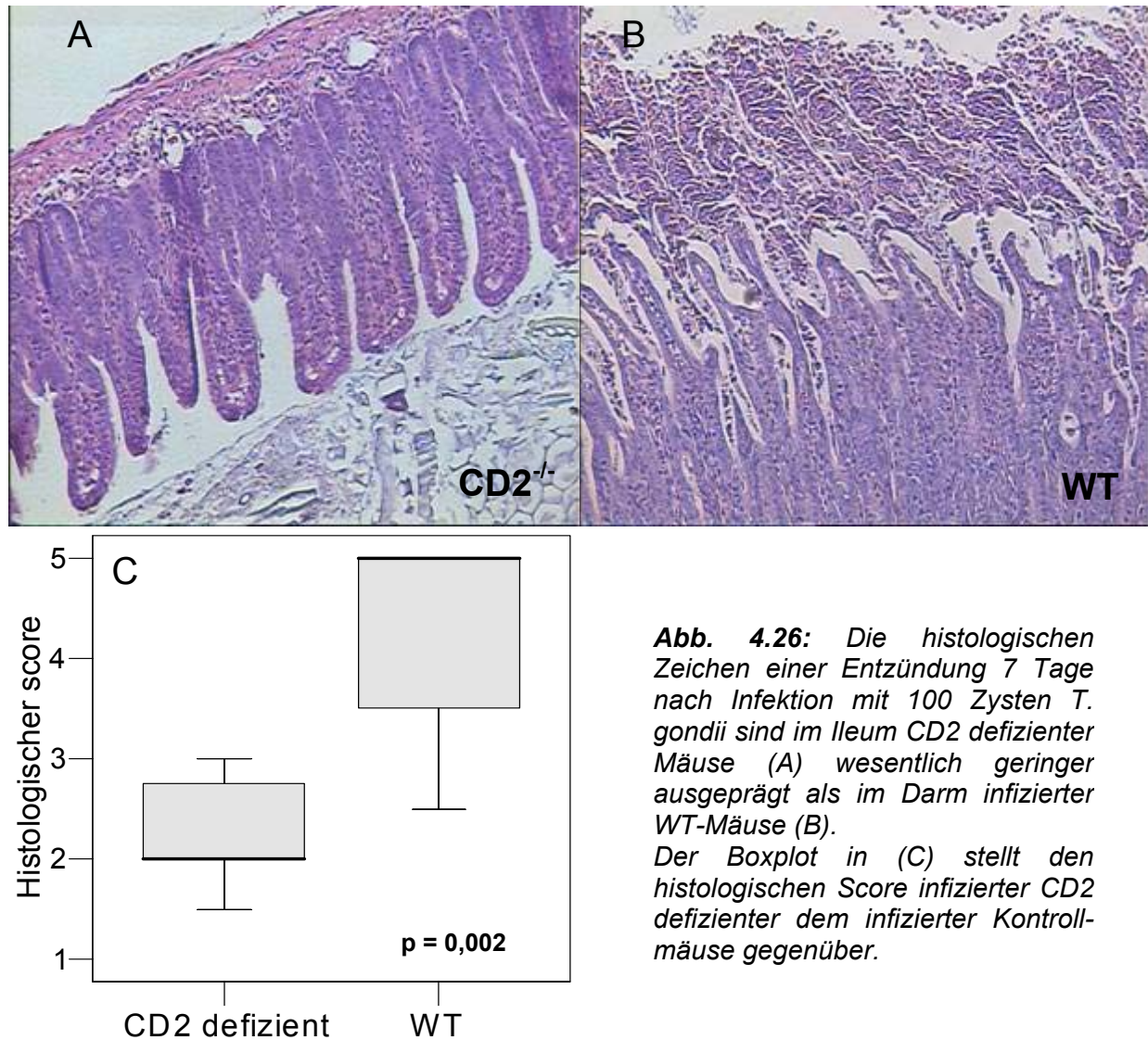


Abb. 4.26: Die histologischen Zeichen einer Entzündung 7 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* sind im Ileum CD2 defizienter Mäuse (A) wesentlich geringer ausgeprägt als im Darm infizierter WT-Mäuse (B).

Der Boxplot in (C) stellt den histologischen Score infizierter CD2 defizienter dem infizierter Kontrollmäuse gegenüber.

Die von den übrigen Mäusen aufgestellte Kaplan-Meier-Überlebenskurve belegt außerdem, dass die CD2 defizienten Mäuse signifikant länger überlebten als die Wildtyp-Mäuse ($23,5 \pm 3,8$ vs. $7,1 \pm 0,3$; Abb. 4.27).

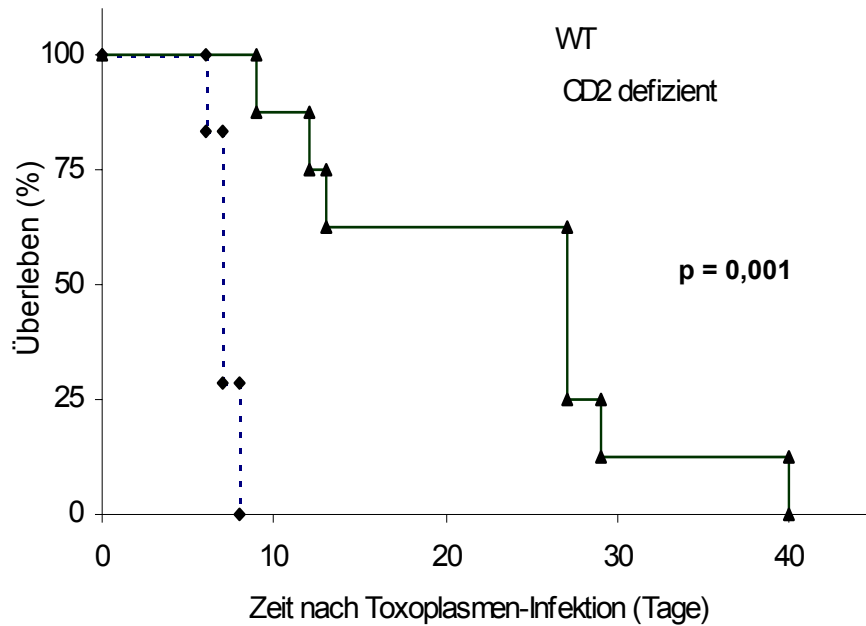


Abb. 4.27: Das Überleben von mit *T.gondii* infizierten CD2 defizienten Mäusen ($n = 8$) war verglichen mit dem von Wildtyp-Mäusen ($n = 7$) signifikant länger.

Die Folge einer CD2 Defizienz für eine Infektion von Mäusen mit Toxoplasmen sind somit ein verlängertes Überleben, eine geringere Ausprägung der Darmentzündung, geringere Toxoplasmentiter und eine Modulation der Synthese inflammatorischer Zytokine Toxoplasmen infizierter Mäuse. Insgesamt wirkt sich eine CD2 Defizienz somit protektiv auf eine *T. gondii*-Infektion von Mäusen aus.

4.3 Humane *in vitro*-Versuche

Die vorangegangenen *in vitro*- und *in vivo*-Versuche des anti-CD2 mAk 12-15 haben bewiesen, dass im Colitismodell der Maus eine Modulation von CD2 therapeutisch wirksam sein kann. Da eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen nicht möglich ist, müssen *in vitro*-Untersuchungen an humanen T-Zellen bzw. human CD2 transgenen Zellen zunächst Aufschluss darüber geben, ob dieser Mechanismus prinzipiell auch für den Menschen von Nutzen sein kann.

Die Arbeitsgruppe um H. Groux hat im Jahr 2001 eine L-Zelllinie beschrieben, die humanes CD58 (L-58) exprimiert und T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp sowie Zytokinprofil induziert (T_{reg})⁶⁵. Bei dem Versuchsaufbau der Arbeitsgruppe um Groux wurden aufgereinigte CD4 positive T-Zellen über CD3 und Mitomycin-behandelte bzw. bestrahlte L-Zellen aktiviert. So behandelte T-Zellen proliferieren nicht, produzieren einerseits nur geringe Mengen IL-2 und IFN- γ , andererseits jedoch viel IL-10. Somit weisen diese Zellen verschiedene Eigenschaften regulatorischer T-Zellen auf. Setzt man in dieser Versuchsanordnung statt der CD58-exprimierenden Zellen solche Zellen ein, die neben CD58 auch CD80 exprimieren (L-58/80), proliferieren die CD4⁺ Zellen sehr stark, produzieren viel IL-2 sowie IFN- γ , jedoch kaum IL-10. Als Schlussfolge dieser Beobachtung scheint somit die Interaktion von CD58 für den regulatorischen Phänotyp verantwortlich zu sein.

Da es sich bei CD58 um einen Liganden von CD2 handelt, sollten in einem ähnlichen System verschiedene humane anti-CD2 mAk getestet werden. Ziel dieser Untersuchungen sollte sein, einen oder mehrere anti-CD2 Antikörper zu identifizieren, die ebenfalls in der Lage sind, T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp zu induzieren. Dazu wurden 17 verschiedene anti-CD2 mAk (siehe Material und Methoden 3.1.4) zum einen auf ihr Potential hin untersucht, zur Anergie zu führen bzw. die Proliferation zu inhibieren, und zum anderen wurde das Zytokinprofil von Lymphozyten nach Stimulation und Inkubation mit den verschiedenen anti-CD2 mAk betrachtet.

4.3.1 Hemmung der Proliferation über L-58-Zellen

In einem ersten Schritt war es erforderlich, die von Wakkach et al. beschriebenen Versuche ⁶⁵ zu reproduzieren und eine geeignete CD3-Stimulation auszutesten. Abb. 4.29 zeigt exemplarisch einen von 4 Titrationsversuchen.

In allen gewählten anti-CD3-Konzentrationen proliferierten jene peripheren T-Zellen (PBL) am stärksten, die über CD58/80 exprimierende L-Zellen kostimuliert wurden. CD58-exprimierende bzw. Kontroll-L-Zellen (tragen weder CD58 noch CD80) unterdessen führten zu kaum einer Proliferation (siehe Abb. 4.28).

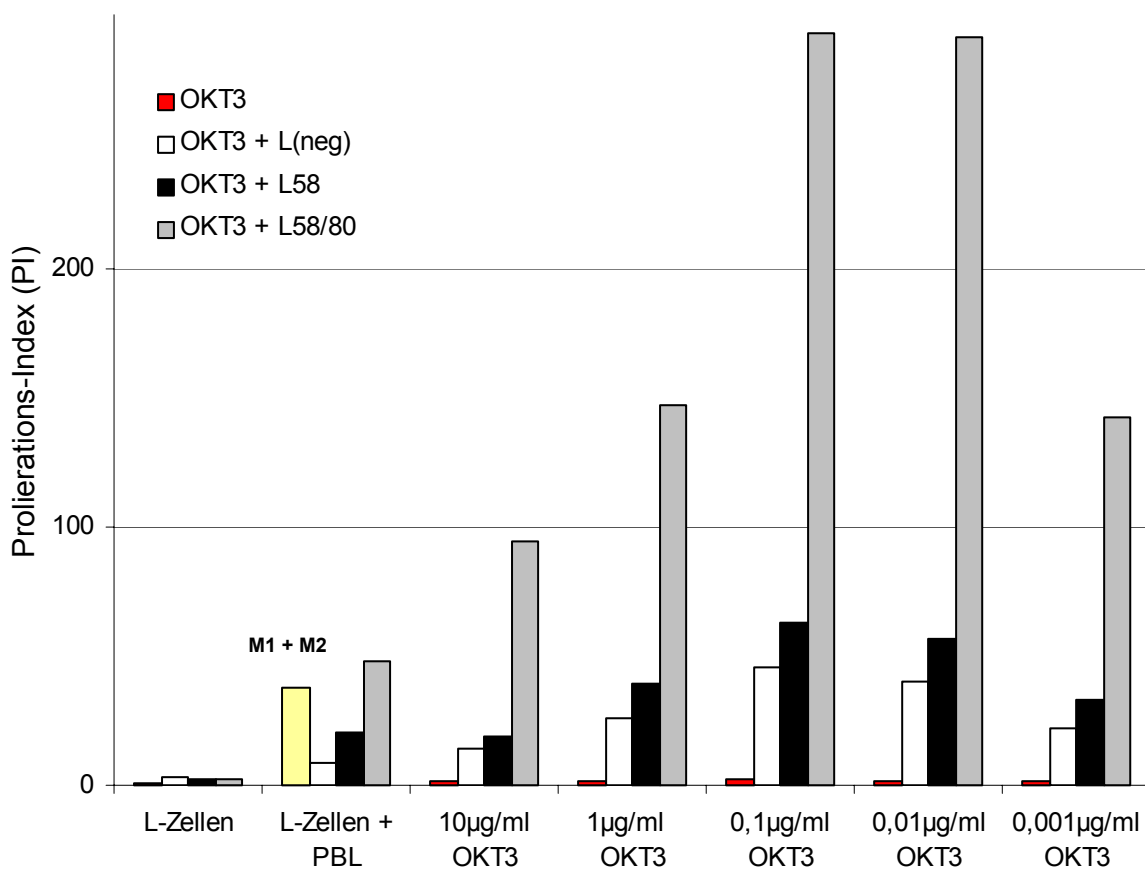


Abb. 4.28: Proliferation von PBL nach Stimulation über verschiedene Konzentrationen von anti-CD3 mAk sowie inaktivierte L- bzw. L-58 und L-58/80-Zellen. Nur in CD58/80 exprimierenden L-Zellen (L58/80) führte eine OKT3-Stimulation zu wesentlicher Proliferation.

Für die weitergehenden Versuche mit Zellen, die über CD3 stimuliert wurden, wurde den Ergebnissen entsprechend eine Konzentration von 0,1 µg/ml löslichem anti-CD3 gewählt.

4.3.2 Hemmung der Proliferation über anti-CD2 mAk

Anders als bei Groux et al.⁶⁵ wurde für die weiteren Untersuchungen der Proliferationshemmung über verschiedene anti-CD2 mAk nicht der Einbau von ³H-Thymidin, sondern die CFSE-Färbung als Proliferationsnachweis genutzt. Bei dieser durchflusszytometrischen Meßmethode wird die Fluoreszenz-Intensität bestimmt, die bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird, und so eine Beurteilung der Proliferationsrate ermöglicht.

PBL bzw. aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen (2 x 10⁶ml) wurden mit CFSE markiert, über CD3/CD28 stimuliert und zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag -1, 0, +1) zusätzlich mit den verschiedenen, potentiell modulierenden anti-CD2 mAk inkubiert. Das Wachstum der T-Zellen wurde an Tag 4 und Tag 6 durchflusszytometrisch gemessen und die durch die anti-CD2 mAk bewirkte Hemmung der Proliferation wurde bestimmt (Berechnung siehe 3.2.9.2). Abbildung 4.29 zeigt die Hemmung der Proliferation an Tag 4 beispielhaft für einen der getesteten anti-CD2 mAk (8E5).

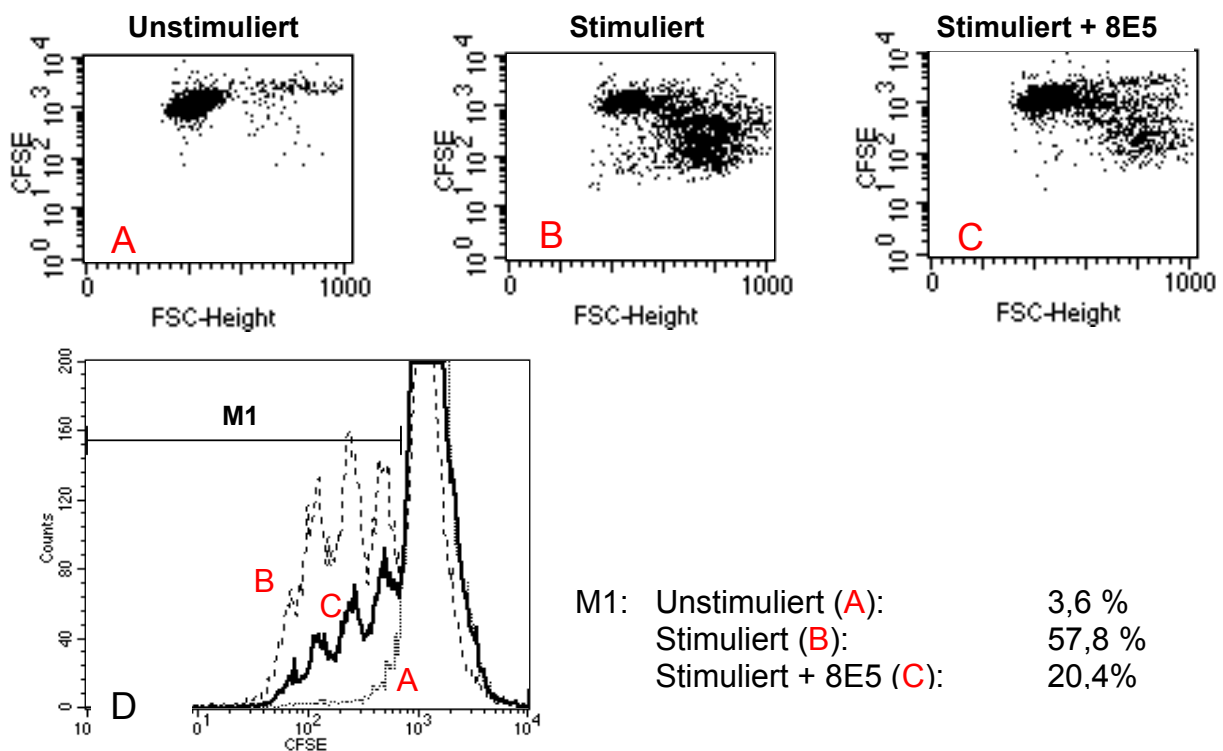


Abb. 4.29: Hemmung der Proliferation CFSE-markierter PBL über den anti-CD2 mAk 8E5 4 Tage nach CD3/CD28-Stimulation. Verglichen wurden unstimulierte PBL (A) mit stimulierten PBL (B) und stimulierten Zellen, die zusätzlich mit einem anti-CD2 mAk (8E5) inkubiert wurden (C). In (D) sind die Histogramme von (A-C) übereinander gelegt. M1 markiert den Prozentsatz der seit Tag 0 proliferierten Zellen.

Dargestellt werden zum einen die Zellgröße (FSC = Vorwärtsstreulicht) gegen CFSE-Markierung (Fluoreszenz 1) unstimulierter (A), stimulierter (B) bzw. solcher Zellen, die stimuliert und mit dem anti-CD2 mAk 8E5 inkubiert wurden (C). In dem Histogramm (Abb. 4.29 D) wurden zur Verdeutlichung die Histogramme der Proben A, B, und C übereinander gelegt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Versuchen mit verschiedenen humanen Lymphozyten-Populationen erörtert.

4.3.2.1 Untersuchungen an PBL

Es wurden verschiedene humane anti-CD2 mAk auf ihr Potential getestet, eine über CD3 und CD28-Stimulation induzierte Proliferation zu inhibieren. Von den 17 getesteten anti-CD2 mAk hemmten 8 Antikörper die Proliferation (definiert als durchschnittlich mehr als 25% Hemmung der Proliferation) von peripheren T-Lymphozyten (Abb. 4.30; n = 8). Abbildung 4.30 zeigt die Ergebnisse eben dieser 8 ausgewählten Antikörper. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM von 8 untersuchten Spendern.

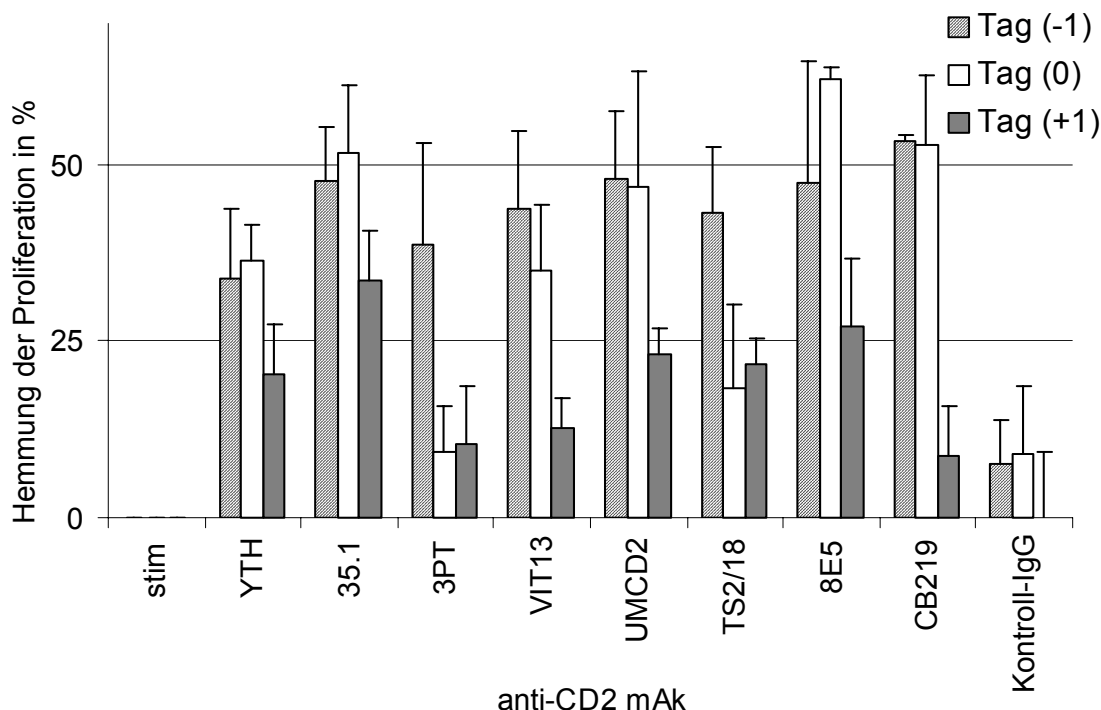


Abb. 4.30: Gezeigt ist die durch Zugabe von verschiedenen anti-CD2 mAk zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag -1, 0, +1) induzierte Hemmung der Proliferation CD3/CD28-stimulierter PBL nach 4 Tagen.

Das Wachstum wurde am stärksten inhibiert, wenn die anti-CD2 mAk an Tag 0 zu dem Ansatz gegeben wurden. Die geringste Hemmung fand sich bei Zugabe der anti-CD2 mAk an Tag +1. Insgesamt fand sich nach 4 Tagen Wachstum eine stärkere Hemmung der Proliferation als nach 6 Tagen (nicht gezeigt).

Auf Grund dieser Erkenntnisse sowie auf Grund früherer Ergebnisse wurden folgende anti-CD2 mAk an aufgereinigten CD4⁺ peripheren T-Zellen weiter ausgetestet:

YTH, 35.1, 3PT, VIT13, UMCD2, TS2/18, 8E5, CB219

4.3.2.2 Untersuchungen an CD4⁺ peripheren T-Zellen

Analog zu den PBL-Versuchen wurden Untersuchungen zur Hemmung der Proliferation nach Inkubation mit den verschiedenen anti-CD2 mAk unter Verwendung von gereinigten CD4⁺ T-Zellen (n = 5) durchgeführt. Um eine ausreichende Proliferationsrate dieser Zellen zu erreichen, erfolgte eine zusätzliche Stimulation der Lymphozyten mit rekombinantem IL-2 (50 U/ml). Auch in diesen Versuchen konnte die Proliferation der stimulierten Zellen durch die ausgewählten anti-CD2 mAk gehemmt werden (Abb. 4.31).

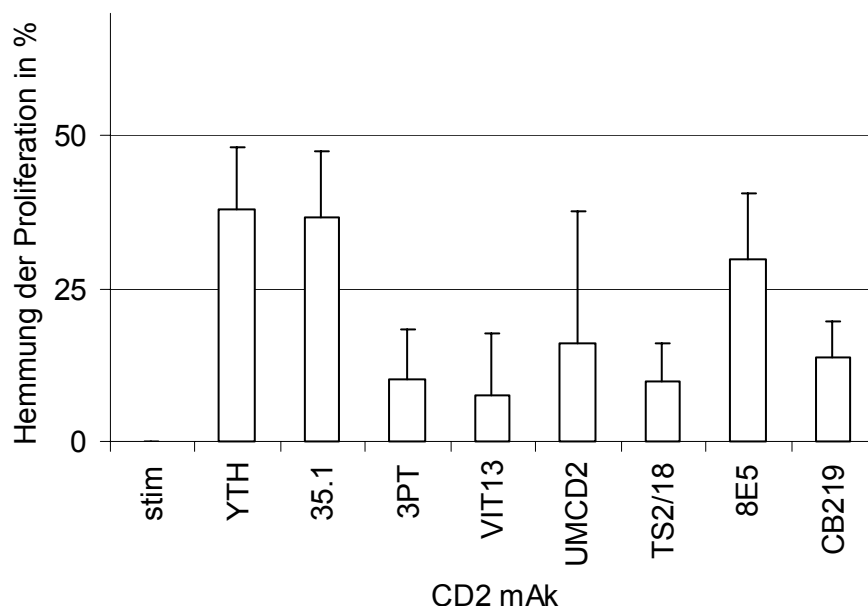


Abb. 4.31: Gezeigt ist die durch die Zugabe von unterschiedlichen anti-CD2 mAk induzierte Hemmung der Proliferation von aufgereinigten, CD3/CD28 stimulierten CD4⁺ Lymphozyten nach 4 Tagen.

Eine Hemmung von durchschnittlich über 25% wiesen jedoch in diesen Ansätzen nur folgende Antikörper auf: **YTH, 35.1, 8E5**.

Wie bei den Untersuchungen an PBL war die Hemmung der Proliferation an Tag 4 und bei Zugabe der anti-CD2 mAk an Tag 0 am stärksten. Allerdings war bei den Versuchen mit CD4⁺ Zellen die Hemmung insgesamt geringer. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass zum einen Antigen-präsentierende Zellen als zusätzlicher Stimulus fehlten, und zum anderen die ebenfalls CD2-exprimierenden NK-Zellen fehlten.

Von den 17 getesteten anti-CD2 mAk haben 8 Antikörper die Fähigkeit, die Proliferation stimulierter Zellen zu inhibieren. Wie mittels Propidiumiodid-Färbung festgestellt wurde, führte außer dem anti-CD2 mAk YTH keiner der getesteten anti-CD2 mAk zu einer gesteigerten Anzahl an nekrotischen Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Hemmung der IFN- γ Synthese durch anti-CD2 mAk

Um in einem weiteren Schritt die Modulation der Zytokinproduktion über CD2 zu untersuchen, wurden dem Protokoll von Groux et al. entsprechend aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen bzw. PBL und LPL (1×10^6 /ml) über CD3 stimuliert (10 μ g/ml, gecoatet) und mit den verschiedenen, humanen anti-CD2 mAk (10 μ g/ml) inkubiert. Nach 48 Stunden wurden mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Kits die Konzentrationen von IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ sowie TGF- β im Überstand bestimmt. Die prozentuale Hemmung der Zytokinsynthese durch die potentiell modulierenden anti-CD2 mAk wurde wie unter 3.2.10 beschrieben berechnet.

4.3.3.1 Untersuchungen an peripheren Lymphozyten

Während die Produktion von IL-2 bei allen getesteten Proben (CD4⁺ T-Zellen: n = 11; PBL: n = 6) unter der Nachweisgrenze lag und keiner der Antikörper zu einer Induktion von IL-6, IL-10 oder TGF- β (nicht gezeigt) führte, hemmten 6 der getesteten anti-CD2 mAk (**35.1, TS2/18, UMCD2, 8E5, YTH, CB219**) in beiden Zell-Populationen die IFN- γ Sekretion nach CD3/CD28-Stimulation um durchschnittlich mehr als 50% (Abb. 4.32).

Andererseits konnten die anti-CD2 mAk VIT13 und 3PT nur die IFN- γ Sekretion aufgereinigter CD4⁺ T-Zellen um durchschnittlich mehr als 50% hemmen.

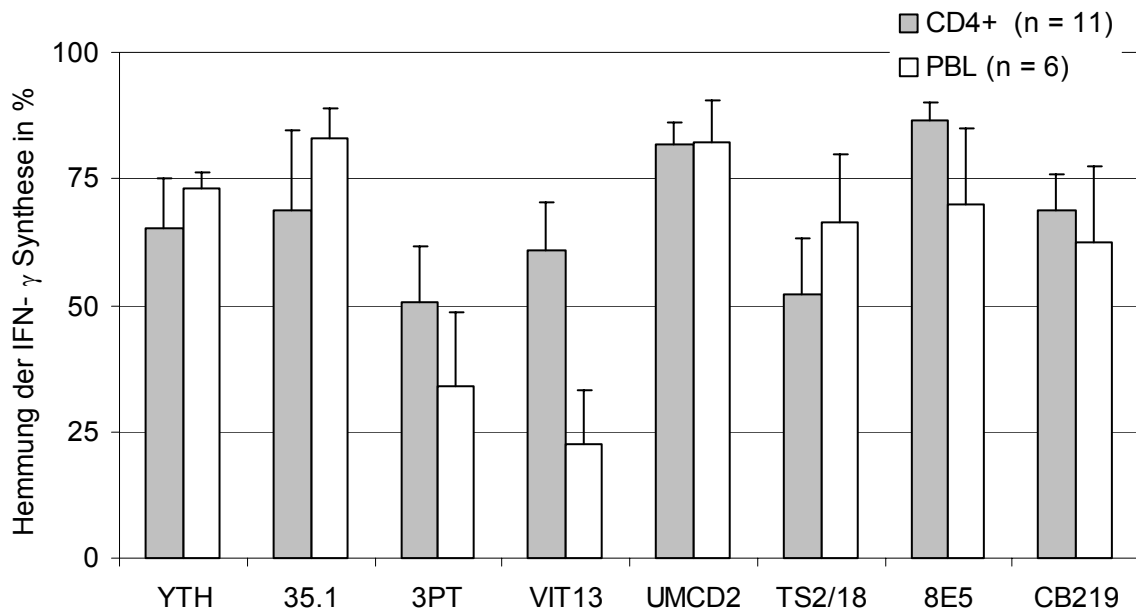


Abb. 4.32: Gezeigt ist die Hemmung der IFN- γ Synthese CD3-stimulierter aufgereinigter CD4⁺ T-Zellen bzw. PBL nach Zugabe verschiedener anti-CD2-mAk. Die Zytokine im Zellkulturüberstand wurden nach 48 Stunden mit Hilfe des ELISA bestimmt. Angegeben ist die prozentuale Hemmung bezogen auf stimulierte Zellen.

4.3.3.2 Untersuchungen an intestinalen Lymphozyten

Dass Unterschiede zwischen peripheren (PBL) und intestinalen (LPL) Lymphozyten bestehen, wurde eingangs bereits erläutert. Deswegen wurde ebenfalls der Einfluss der verschiedenen anti-CD2 mAk auf die Zytokinsynthese stimulierter intestinaler T-Zellen analysiert.

Auch bei intestinalen Lymphozyten war keiner der getesteten anti-CD2 Antikörper in der Lage, eine vermehrte IL-10 Produktion zu induzieren. Die IFN- γ Synthese humaner LPL (n = 6) nach CD3-Stimulation konnte ebenso durch verschiedene anti-CD2 mAk (**8E5**, **VIT13**, **YTH**, **CB219**, **3PT**) um durchschnittlich mehr als 50% gehemmt werden (Abb. 4.33). Dargestellt werden Mittelwert und SEM der prozentualen Hemmung durch den jeweiligen anti-CD2 mAk.

Ein deutlich anderes Ergebnis als die Untersuchungen peripherer Lymphozyten lieferte lediglich der anti-CD2 mAk TS2/18, der bei den LPL keine hemmende Wirkung auf die IFN- γ Synthese hatte.

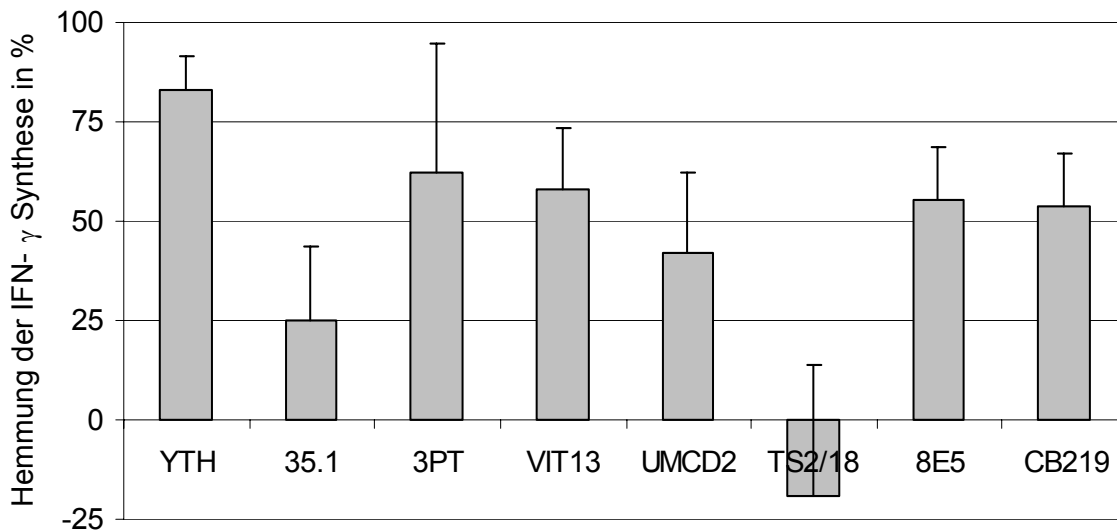


Abb. 4.33: Gezeigt ist die prozentuale Hemmung der IFN- γ Synthese stimulierter Lymphozyten der Lamina propria ($n = 6$). Die Zellen wurden über CD3-stimuliert, mit den verschiedenen CD2 mAk inkubiert, und im 48 Stunden-Überstand wurden die Zytokine mittels ELISA bestimmt.

Im Gegensatz zu peripheren Lymphozyten konnte bei intestinalen Lymphozyten für den anti-CD2 mAk 8E5 eine signifikante Hemmung der IL-2 Synthese (Hemmung $55 \pm 20,1\%$; $p = 0,014$) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich der IL-6 und TGF- β Produktion traten keine Unterschiede auf.

Folgende anti-CD2 mAk konnten in allen getesteten Zellpopulationen die IFN- γ Synthese stimulierter Zellen um durchschnittlich mehr als 50% inhibieren:

8E5, YTH, CB219

4.3.4 Induktion regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen werden nicht nur durch ihr spezielles Zytokin-Profil und ihre Fähigkeit Anergie zu induzieren charakterisiert, sondern weisen auch ein spezifisches Muster von Oberflächenrezeptoren (z. B. CD25, CD152, $\alpha 7\beta 4$) auf. Um die Induktion regulatorischer T-Zellen durch verschiedene anti-CD2 mAk zu überprüfen wurden entweder über MACS-Negativselektion gewonnene CD4⁺ T-Zellen (siehe 3.2.1.6) oder PBL (1×10^6 /ml) mit OKT3 ($1 \mu\text{g/ml}$, löslich) sowie mit den verschiedenen anti-CD2 mAk ($10 \mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach 3 Tagen Stimulation wurde durchflusszytometrisch

sowohl die Expression von CD4 und CD25, als auch die Expression von CD152 über bestimmt.

Die Abbildung 4.34 zeigt zum einen den Anteil CD4/CD25 positiver Zellen ($n = 9$), und zum anderen die Frequenz CD4/CTLA-4 positiver Zellen ($n = 5$). Eine signifikante Zunahme beider Populationen konnte durch keinen der getesteten Antikörper erreicht werden. Nur durch die Kombination der anti-CD2 mAk M1 und M2 (sowie durch OKT11; nicht gezeigt) kam es zu einer geringen Zunahme CD4/CD25 bzw. CD4/CTLA-4 positiver T-Zellen. Insgesamt wurden nach zusätzlicher Inkubation stimulierter Zellen mit einigen anti-CD2 mAk (35.1, UMCD2, 8E5) sogar signifikant weniger CD4/CD25 positive Zellen nachgewiesen (Abb. 4.34; Pfeile).

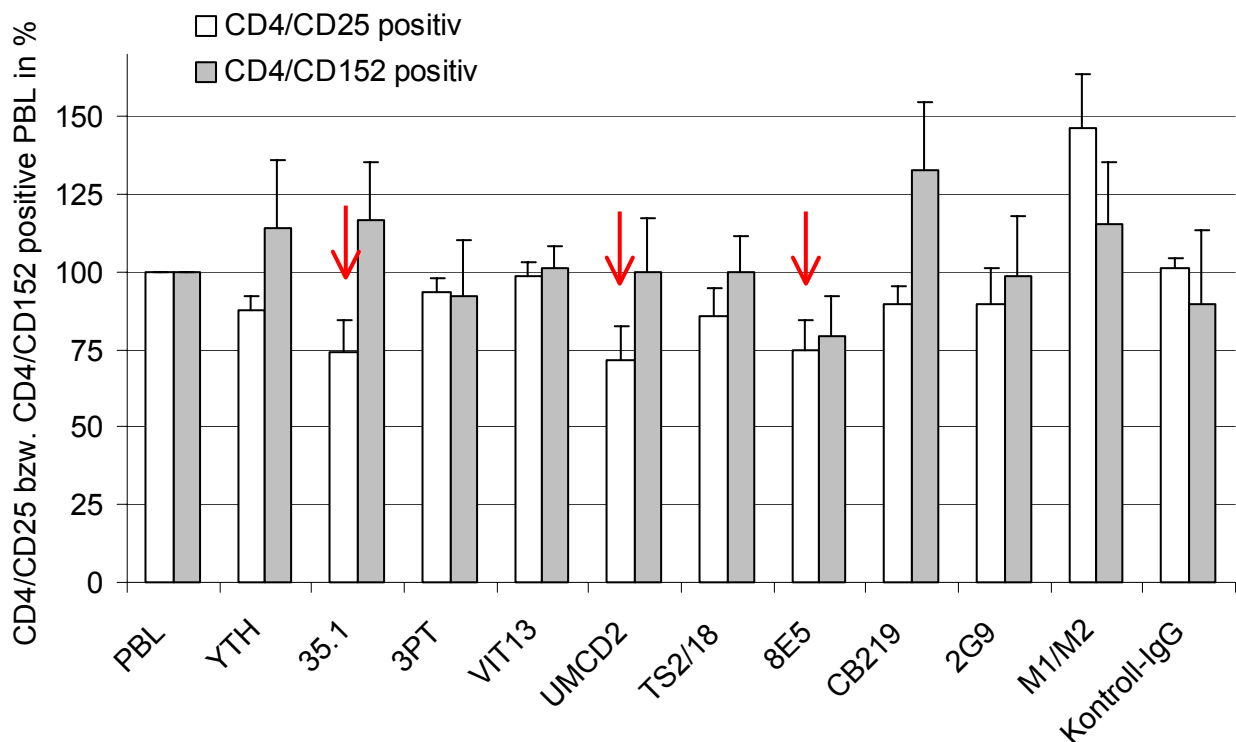


Abb. 4.34: Die Zugabe von anti-CD2 mAk führte zu keiner Induktion von regulatorischen T-Zellen. Die Zellen wurden über CD3/CD28 stimuliert und für 3 Tage mit den verschiedenen CD2 mAk inkubiert. Keiner der getesteten anti-CD2 mAk führte zu einer signifikanten Zunahme regulatorischer T-Zellen. Die anti-CD2 mAk 35.1, UMCD2 und 8E5 (Pfeile) senkten im Gegenteil dazu sogar die Zahl CD4/CD25 positiver Zellen.

Somit ist eine Induktion regulatorischer T-Zellen durch die untersuchten anti-CD2 mAk sehr unwahrscheinlich.

4.3.5 *In vitro*-Versuche an human CD2tg Lymphozyten

Bevor Ergebnisse aus *in vitro*-Versuchen in humanen Studien getestet werden können, müssen *in vivo*-Untersuchungen in einem System erfolgen, das dem humanen möglichst ähnlich ist. Für diese Untersuchung eignen sich transgene Systeme. Daher schlossen sich den humanen *in-vitro*-Untersuchungen Versuche mit Zellen human CD2-transgener Mäusen an. Diese Mäuse tragen funktionell aktives humanes CD2, und eignen sich somit besonders gut für solche Untersuchungen. *In vivo*-Untersuchungen müssen auch hier *in vitro*-Versuche vorangestellt werden, um zunächst die humanen *in vitro*-Ergebnisse an human CD2tg Zellen zu bestätigen.

Die untersuchten stimulierten Splenozyten, Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten (mLK) und der Lamina propria von human CD2 transgenen Mäusen (huCD2tg) zeigten nach Inkubation mit den potentiell modulierenden humanen anti-CD2 mAk ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchungen an humanem Material. Die Hemmung der Proliferation von stimulierten huCD2tg Splenozyten durch humane anti-CD2 mAk wurde analog zu den in 4.3.2 beschriebenen Versuchen mit humanen T-Zellen wiederum über das Wachstum CFSE-markierter, stimulierter Zellen nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.35 dargestellt, konnte zwar durch verschiedene anti-

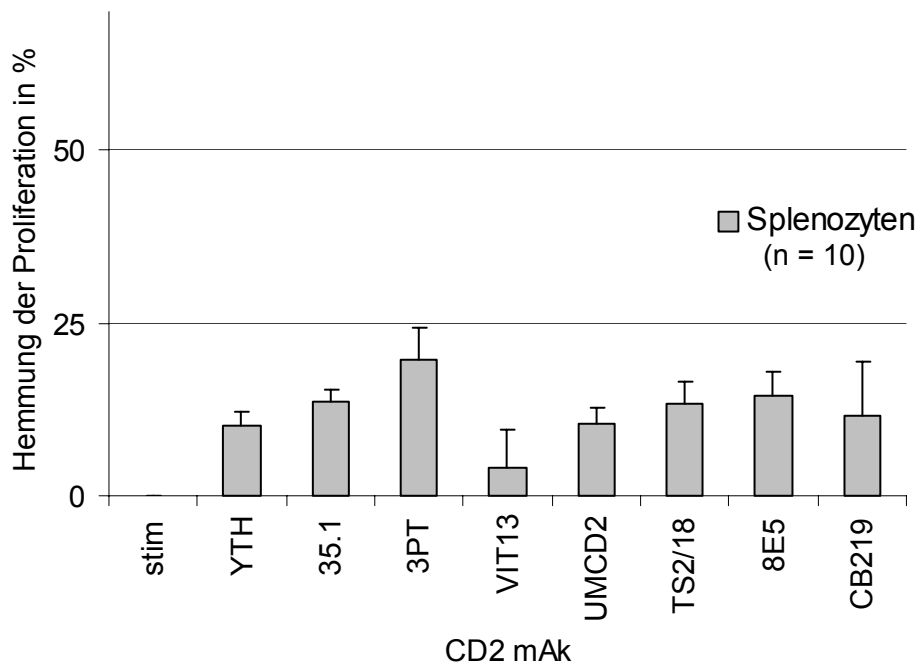


Abb. 4.35: Gezeigt ist durchschnittliche Hemmung der Proliferation CD3/CD28 stimulierter Splenozyten aus huCD2tg Mäusen nach Zugabe verschiedener anti-CD2 mAk an Tag 4.

CD2 mAk eine Hemmung der Proliferation nach 4 Tagen erreicht werden, diese war jedoch weniger ausgeprägt als bei Verwendung humaner Zellen.

Die Hemmung der IFN- γ Synthese stimulierter, huCD2tg Splenozyten über die verschiedenen anti-CD2 mAk wurde ebenfalls analysiert. Analog zu den Versuchen an humanen Lymphozyten (4.3.3) wurden nach 48 Std. Inkubation die Zytokine im Überstand gemessen. Eine durchschnittliche Hemmung der INF- γ Synthese um über 50% konnte unter Verwendung von stimulierten huCD2tg Splenozyten (n = 8) durch die anti-CD2 mAk **8E5**, **YTH** und **3PT** erreicht werden (Abb. 4.36).

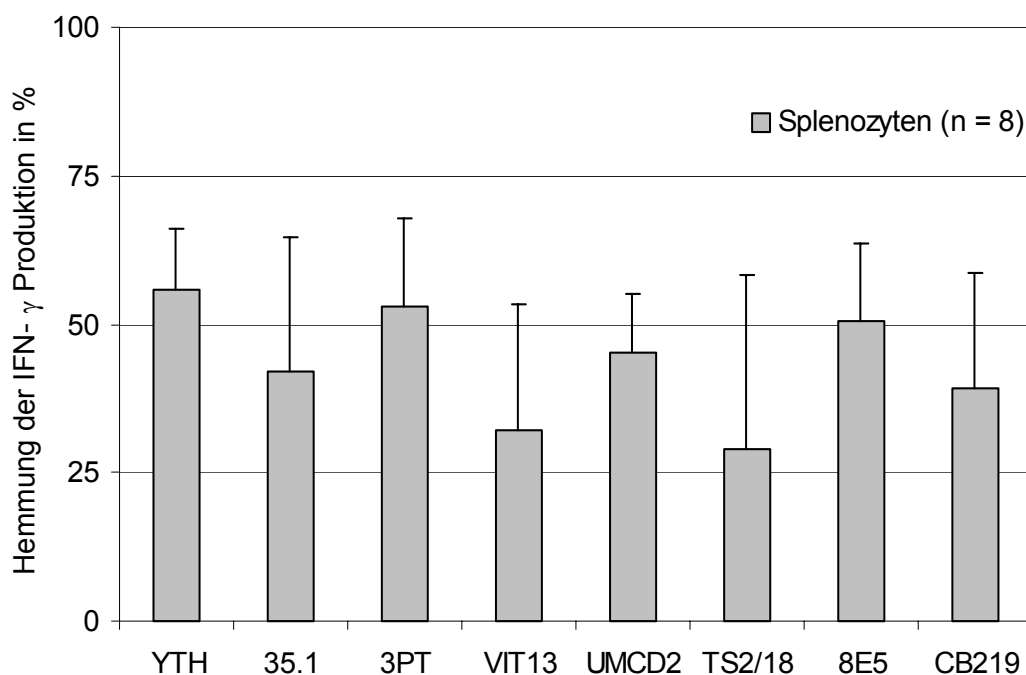


Abb. 4.36: Gezeigt ist die prozentuale Hemmung der IFN- γ Synthese stimulierter Splenozyten human CD2 transgener Mäuse. Die Zellen wurden über CD3-stimuliert, mit den verschiedenen CD2 mAk inkubiert, und im 48 Stunden-Überstand wurden die Zytokine mittels ELISA bestimmt.

Somit ist es auch bei Zellen huCD2tg Mäuse möglich, über verschiedene humane anti-CD2 mAk eine Modulation der Proliferation und der Zytokinsekretion zu erreichen.

4.3.6 Zusammenfassung der humanen *in vitro*-Ergebnisse

Die nachfolgenden Tabellen 4.2 und 4.3 fassen die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zur Modulation der IFN- γ Sekretion (4.2) bzw. zur Inhibition der Proliferation (4.3) stimulierter humaner, bzw. human transgener Lymphozyten durch 8 der 17 getesteten humanen anti-CD2 mAk zusammen:

Tab. 4.2: Modulation der IFN- γ Sekretion

Zellen/anti-CD2 mAk	YTH	35.1	3PT	VIT13	UMCD2	TS2/18	8E5	CB219
Humane CD4 ⁺	++	++	++	++	+++	++	+++	++
Humane PBL	++	+++	+	(+)	+++	++	++	++
Humane LPL	+++	+	++	++	+	(+)	++	++
HuCD2tg Splenozyten	++	+	++	+	+	+	++	+

- +++ > 75% Hemmung der IFN- γ Synthese
- ++ > 50% Hemmung der IFN- γ Synthese
- + > 25% Hemmung der IFN- γ Synthese
- (+) < 25% Hemmung der IFN- γ Synthese

Tab. 4.3: Hemmung der Proliferation

Zellen/anti-CD2 mAk	YTH	35.1	3PT	VIT13	UMCD2	TS2/18	8E5	CB219
Humane CD4 ⁺	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)
Humane PBL	+	++	(+)	+	+	(+)	++	++
HuCD2tg Splenozyten	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

- ++ > 50% Hemmung der Proliferation
- + > 25% Hemmung der Proliferation
- (+) < 25% Hemmung der Proliferation

Fasst man die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zur Hemmung der IFN- γ Synthese sowie der Hemmung der Proliferation stimulierter Lymphozyten durch humane anti-CD2 mAk zusammen, so werden diese am effektivsten durch folgende anti-CD2 mAk gehemmt: **YTH, 35.1, UMCD2, 8E5** und **CB219**.