

5. Diskussion

Der Fokus der vorliegenden Untersuchungen lag auf dem kostimulatorisch wirksamen Adhäsionsmolekül CD2. Da CD2 ein wesentlicher Bestandteil der immunologischen Synapse ist, wird ihm nicht nur eine besondere Bedeutung bei der T-Zellaktivierung (insbesondere intestinaler T-Zellen) zugeschrieben^{1, 10-12, 17, 19}. CD2 ist darüber hinaus auch an der Synthese inflammatorischer Zytokine wie IL-2 beteiligt¹²⁶. Daher erscheint eine Modulation über CD2 ein geeigneter Ansatzpunkt für eine Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen zu sein. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass anti-CD2 mAk das Potential haben, die Entwicklung einer adoptiven Transfercolitis zu verzögern bzw. die Entzündung bei etablierter Transfercolitis zu verringern.

5.1 Einfluss des murinen anti-CD2 mAk 12-15 auf adoptive Transfercolitis

Ein histologisches Charakteristikum chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen sind Infiltrate mononukleärer Zellen, die hauptsächlich aus CD4⁺ Lymphozyten bestehen. Auslöser dieser Infiltrate scheinen eine gesteigerte Proliferation¹²⁷, Störungen in der Apoptose intestinaler T-Zellen^{30, 31}, eine gesteigerte Lymphokinproduktion^{22, 127} sowie eine gesteigerte Adhäsion¹²⁸ zu sein. Um die zugrunde liegenden Prozesse zu untersuchen und um effektive CED-Immuntherapien zu entwickeln, sind Tiermodelle hilfreich. Das sehr häufig genutzte Modell der murinen Transfercolitis imitiert CED insofern, dass sich im Darm der Mäuse nach Transfer eine Th₁-dominierte Erkrankung manifestiert, die sowohl durch eine gesteigerte Adhäsion als auch durch gesteigerte Proliferation und Apoptose gekennzeichnet ist^{129, 130}. In diesem Modell werden entweder ConA-stimulierte CD4 positive T-Zellblasten oder gereinigte CD45RB^{high} exprimierende T-Helferzellen auf immundefiziente Empfängertiere, denen reife B- und T-Zellen fehlen, transferiert. So kann mit Hilfe dieses Modells, der sogenannten adoptiven Transfercolitis, z.B. die Rolle von T-Zellen in CED hinsichtlich Zytokindysregulation, gesteigerter T-Zellproliferation, und möglicherweise gesteigerter Adhäsion optimal untersucht werden. Ein Vorteil des Transfers von CD4⁺ T-Zellblasten

auf Rag defiziente bzw. SCID-Mäuse gegenüber dem Transfer von CD45RB^{high} T-Zellen ist die hohe Reproduzierbarkeit der resultierenden Erkrankung sowie eine sehr stark ausgeprägte Form der Colitis.

Wie sich in dieser Arbeit zeigte, hat die Behandlung mit Antikörpern, die sich gegen das T-Zell-Antigen CD2 richten, einen positiven Einfluss auf die Schwere sowie den Verlauf von chronisch-entzündlichen Prozessen. Weitere Experimente, die das klassische Modell der Transfercolitis (Transfer von CD45RB^{high}-Zellen) nutzten, machten deutlich, dass der verwendete anti-CD2 mAk 12-15 die Transfercolitis zwar verzögerte, die Tiere jedoch nicht vor der Entwicklung einer Colitis schützen konnte. Erklärungen hierfür könnten zum einen die Unterschiede in der Kinetik als auch in der Schwere der Entzündung der beiden verwendeten Modelle liegen. Während die Entzündung nach dem Transfer ConA-aktivierter T-Zellblasten sich innerhalb von etwa 5 Wochen manifestiert und bei unbehandelten Kontrolltieren innerhalb von 2 Wochen nach Colitisbeginn letal ist, setzt eine durch den Transfer von CD45RB^{high} T-Zellen induzierte Colitis wesentlich später ein, und verläuft insgesamt weniger schwerwiegend. Dass CD2 vor allem in der frühen Rekrutierungsphase antigen-spezifischer Zellen eine große Rolle spielt, wurde schon früher gezeigt⁶⁷. Im Gegensatz dazu findet die Differenzierung und Expansion antigen-spezifischer Zellen nach dem ersten Kontakt weitgehend unabhängig von CD2 vermittelten Signalen statt. Diese Beobachtungen stimmen auch mit unseren Ergebnissen überein, die zeigen, dass eine Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 dann am effektivsten ist, wenn sie in der Frühphase der Transfercolitis begonnen wird.

Da bei CED nicht nur die Proliferation von T-Zellen in der Lamina propria und der Submucosa signifikant gesteigert ist¹²⁷, sondern unter Umständen auch die Synthese inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-2 und IFN- γ ^{19, 131}, erschien ein Therapieansatz sinnvoll, der die Reaktivität jener als voraktiviert eingestuft intestinalen Lymphozyten dämpft. Verschiedene Antikörper oder Agonisten gegen wichtige zelluläre Adhäsionsmoleküle erwiesen sich im Tiermodell bereits als vielversprechend¹³²⁻¹³⁴.

Der in den vorliegenden Untersuchungen verwendete anti-CD2 mAk 12-15 ist ein gut charakterisierter Antikörper, von dem bereits bekannt war, dass er nicht durch

Depletion, sondern durch Internalisierung zu einer Verminderung der CD2-Expression führt^{67, 91, 135, 136}. Dass dieser Antikörper T-Zellen nicht depletiert, konnte in dieser Arbeit ebenfalls durch den Nachweis transferierter, CFSE-markierter T-Zellen bei anti-CD2 gerichtete Therapie der Rezipienten bestätigt werden. Über den Einfluss des anti-CD2 mAk 12-15 auf die Expression anderer Oberflächenrezeptoren gibt es dagegen widersprüchliche Aussagen. Es wurde sowohl eine gesteigerte Expression verschiedener Moleküle (z.B. LFA1, CD44, CD45, CD62) nach Gabe des Antikörpers beschrieben¹³⁷ als auch beispielsweise eine Senkung der CD49 Expression¹³⁵. Währenddessen beschreibt eine andere Arbeitsgruppe, dass die Bindung des anti-CD2 mAk 12-15 keinerlei Auswirkung auf die Expression anderer Oberflächenmoleküle hat⁶⁷. Insgesamt ist die Relevanz weiterer Oberflächenmoleküle für die therapeutische Wirkung dieses Antikörpers daher fraglich.

CD2 ist ein wesentlicher Bestandteil der immunologischen Synapse und kann somit möglicherweise auf deren vielfältige Aufgaben Einfluss nehmen. So könnte es sein, dass die Bindung des anti-CD2 mAk 12-15 an seinen Rezeptor zu einer Modulation der immunologischen Synapse und als Folge davon zu Veränderungen z. B. bei der T-Zellaktivierung oder einer gerichteten Zytokinsynthese führt. Da T-Zellen CD2-defizienter Mäuse eine stärkere Stimulation zur Aktivierung benötigen¹³⁸, wird auch vermutet, dass CD2 möglicherweise quantitativ die T-Zell-Antigen-Erkennung dadurch steigert, dass es T-Zellen ermöglicht, auch auf geringere Antigen-Konzentrationen zu reagieren. Bei einer Dysbalance der Immunantwort, wie sie z.B. im Falle einer Transfercolitis auftritt, wirkt sich diese erhöhte Sensibilität möglicherweise pathologisch aus. Ebenfalls wäre es möglich, dass durch die Bindung des anti-CD2-mAk der Abstand zwischen T-Zellen und den Antigen-präsentierenden Zellen verändert wird. Folge dessen könnte sein, dass eine optimale Bindung von Peptid-MHC-Komplex und TZR nicht mehr möglich ist¹³⁹, und dadurch eine überschießende Aktivierung der Zellen verhindert wird.

Frühere Studien haben gezeigt, dass anti-CD2 mAk chronisch-entzündliche Erkrankungen wie z.B. die Adjuvants-Arthritis bessern können⁹⁷ und auch in der Lage sind, das Überleben nach Transplantationen in verschiedenen Spezies zu verlängern⁹¹.

^{95, 102, 140}. Dabei sind die Mechanismen, über die gegen CD2 gerichtete Antikörper in entzündliche Prozesse eingreifen können, vielfältig. Beispielsweise erzielt der anti-Ratten CD2 mAk OX34 seine Wirkung im Arthritis-Modell zumindest teilweise über eine spezifische Depletion von CD4⁺ T-Zellen ⁹⁷. Für den häufig in murinen Transplantations-Modellen eingesetzten anti-CD2 mAk 12-15 ist eine Senkung der CD2-Expression durch Rezeptorinternalisierung beschrieben ⁹¹. Wieder andere anti-CD2 mAk wirken durch eine Hemmung der Zytokinsynthese ^{141, 142} oder z.B. durch die Induktion von „Activation induced cell death“ ^{17, 89, 116, 143}. Das therapeutische Potential von anti-CD2 Antikörpern in CED-Tiermodellen wurde bislang nur bei Ratten mit TNBS-induzierter Colitis untersucht ¹⁴⁴. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieses Modell T-Zell-unabhängig ist, sodass kein Effekt über eine anti-CD2 gerichtete Behandlung erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte nun mit Hilfe von zwei T-Zellabhängigen Colitismodellen gezeigt werden, dass eine CD2-gerichtete Immuntherapie in der Lage ist, den Verlauf einer chronischen Darmentzündung zu beeinflussen.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte der stärkste Effekt einer anti-CD2 gerichteten Behandlung von Transfercolitis dann erreicht werden, wenn die CD2-gerichtete Behandlung gleichzeitig mit dem Transfer der Colitis-induzierenden, ConA stimulierten CD4⁺ Blasten begonnen wurde. Dies entspricht jedoch nicht der klinischen Situation, in der die zu behandelnde Colitis bereits besteht. Geringere Effekte zeigten sich in dem ConA stimulierten Blasten-Modell, wenn die Therapie, unterstützt durch die Applikation von Dexamethason, bei etablierter Colitis begonnen wurde. Im ebenfalls untersuchten Modell der CD45RB^{high}-Transfercolitis konnte durch den anti-CD2 mAk 12-15 lediglich eine Verzögerung des Verlaufs der Entzündung erreicht werden.

Die beiden Mechanismen, dem die Erfolge der anti-CD2 gerichteten Therapie in unseren Versuchen zu Grunde liegt, sind wahrscheinlich zum einen der hemmende Effekt auf die Proliferation von Lymphozyten der Milz und der mLK, und zum anderen die reduzierte IL-2 Synthese durch LPL, Splenozyten und Lymphozyten der mLK. Sowohl eine gesteigerte Proliferation als auch eine vermehrte IL-2 Synthese sind charakteristisch für das Modell der adoptiven Transfercolitis. Beide Effekte lassen

vermuten, dass IL-2 in diesen Modellen als autokriner Wachstumsfaktor wirkt. Diese Wirkung wurde bereits früher beschrieben¹⁴⁵, ist hoch reproduzierbar und ist möglicherweise auch Ursache für die geringere Lymphozyten-Absolutzahl der anti-CD2 behandelten Mäuse am Versuchsende.

Hinsichtlich der IL-2 Produktion nach Bindung von anti-CD2 mAk an CD2 gibt es gegenläufige Befunde. Es ist mehrfach beschrieben, dass nicht nur die Bindung von CD2 an seine Liganden^{126, 146}, sondern *in vitro* auch die Kombination verschiedener mitogener anti-CD2 mAk zu einer gesteigerten Produktion von IL-2 führen^{112, 147, 148}. Andere Arbeitsgruppen haben *in vitro* eine Hemmung der IL-2 Synthese über einzelne, nicht mitogene anti-CD2 mAk beobachtet^{141, 149-152}. Diese Beobachtung stimmt mit den gefundenen Ergebnissen der oben beschriebenen *in vitro*- und *in vivo*-Versuche überein, bei denen ebenfalls eine Hemmung der IL-2 Synthese durch die Bindung des anti-CD2 mAk 12-15 von Bedeutung zu sein scheint.

Physiologisch kommt es vermutlich nach Besetzung des CD2-Rezeptors zur Hochregulation von Bindungskomplexen, die an den IL-2-Promotor binden und dadurch zur Transkription des IL-2-Gens führen¹⁵³. Diese Aktivierung sowie die nachfolgende Proliferation der Lymphozyten wird in den durchgeführten Experimenten vermutlich durch die Modulation von CD2 verhindert. Ein solcher Mechanismus wurde für einen anderen CD2 mAk *in vitro* bereits von der Arbeitsgruppe um Tadmori¹⁵⁴ beschrieben. Zusätzlich scheint es jedoch noch einen weiteren, IL-2 unabhängigen Mechanismus zu geben, der mit für eine verringerte Proliferation nach anti-CD2 Applikation verantwortlich ist. Denn *in vitro* kann die Proliferation nach Stimulation mit einem anti-CD3 mAk, der keine detektierbaren IL-2 Spiegel induziert, ebenfalls durch einen anti-CD2 mAk verhindert werden^{152, 155}. Andererseits ist die Hochregulation von CD2 nach T-Zellaktivierung IL-2 abhängig¹⁵⁶. Wird durch den anti-CD2 mAk 12-15 die IL-2 Synthese blockiert, wird evtl. so auch die erhöhte Expression von CD2 verhindert und dadurch eine überschießende Aktivierung der T-Zellen unterbrochen. Auch eine einfache sterische Blockade des CD2 Moleküls als Ursache für die Hemmung der IL-2 Produktion kommt in Frage.

IL-2 scheint eines der wichtigsten Zytokine zu sein, das in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen Anergie induziert, aufrechterhält bzw. wieder aufhebt (Übersicht in¹⁵⁷). *In vivo*-generierte anerge Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie *ex vivo* wenig IL-2, IL-4 sowie IFN- γ produzieren¹⁵⁸. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit

durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen an stimulierten Zellen belegen, dass der anti-CD2 mAk 12-15 sowohl die Synthese von IL-2, IL-4 als auch die von IFN- γ senkt. Eine durch den anti-CD2 mAk 12-15 verringerte IFN- γ Synthese und Proliferation CD3- bzw. Alloantigen-stimulierter Zellen konnte ebenfalls auch von Bai et al. nachgewiesen werden ¹⁴².

In vivo wird, wie bereits ausgeführt, durch die Behandlung mit dem anti-CD2 mAk 12-15 vor allem die IL-2 Synthese sowie die Proliferation gehemmt, wodurch wahrscheinlich der Verlauf der Transfercolitis verbessert, bzw. verzögert wird. Insgesamt legen die Ergebnisse der murinen *in vitro*- als auch der *in vivo*-Versuche mit dem anti-CD2 mAk 12-15 die Hypothese nahe, dass eine CD2-Modulation über diesen anti-CD2 mAk möglicherweise zur Induktion anerer T-Zellen führt. Gestützt wird diese Hypothese durch die Versuche von Gückel et al., bei denen ebenfalls durch die *in vivo*-Gabe des anti-CD2 mAk 12-15 ein Zustand verringerter T-Zellreaktivität induziert wurde ⁶⁷.

Der theoretischen Möglichkeit einer gesteigerten Wirkung durch eine höhere Dosis des anti-CD2 mAk oder durch kürzere Injektionsintervalle stehen Ergebnisse früherer Transplantationsstudien entgegen, in denen erfolgreich geringere Konzentrationen desselben Antikörpers in vergleichbaren Intervallen verabreicht wurden ⁹¹.

Ein weiterer therapeutischer Mechanismus könnte die Induktion regulatorischer T-Zellen durch den anti-CD2 mAk 12-15 sein. Die vorgestellten durchflusszytometrischen Messungen der CD25- und CD103-Expression CFSE-markierter, CD4⁺ T-Zellen, die auf anti-CD2 mAk behandelte Mäuse transferiert wurden, ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine Induktion regulatorischer T-Zellen durch den anti-CD2 mAk 12-15. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen von Lin et al. überein, die ebenso keinen Effekt des anti-CD2 mAk 12-15 auf die CD25-Expression nachweisen konnten ¹³⁷. Darüber hinaus hat dieselbe Arbeitsgruppe beschrieben, dass dieser Antikörper einen durch anti-CD3, ConA oder PMA induzierten Anstieg der CD25-Expression sogar inhibiert ¹⁵⁹. Weiterhin konnte in den *in vivo*-Versuchen der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein Effekt hinsichtlich der IL-10 Sekretion durch den anti-CD2 mAk 12-15 auf stimulierte Splenozyten beobachtet werden. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass durch den anti-CD2 mAk 12-15 regulatorische T-Zellen induziert werden können. Dieser Punkt erscheint wichtig, da humane *in vitro*-Studien anderer Arbeitsgruppen andeuten,

dass über CD2 regulatorische T-Zellen induziert werden ⁶⁵. Eine Induktion von Th₂-Zytokinen, wie sie von Chavin et al. gezeigt ¹²⁴ wurde, konnte weder durch *in vitro*- noch durch *in vivo*-Versuche reproduziert werden.

Obwohl der anti-CD2 mAk 12-15 das Überleben der Mäuse nach Transfer ConA-stimulierter CD4⁺ Blasten verlängerte, konnte durch diesen Antikörper das Auftreten einer Colitis in den meisten Tieren nicht verhindert werden, und die klinische Effektivität des anti-CD2 mAk 12-15 bei etablierter Colitis ist eingeschränkt. Die wesentlich geringere Wirkung des anti-CD2 mAk 12-15 auf die etablierte Transfercolitis könnte auf eine bereits so stark fortgeschrittene Aktivierung, die „Einnistung“, Proliferation und Zytokinsynthese der transferierten Zellen zurückzuführen sein, dass in dieser Situation eine Modulation von CD2 weniger Einfluss auf die Entzündung nehmen kann als bei präventivem Einsatz.

Ähnliche Ergebnisse zeigten frühere Transplantationsstudien, bei denen durch die Gabe des anti-CD2 mAk 12-15 das Überleben allogener Herztransplantate zwar verlängert werden konnte ⁹¹, eine Toleranz der transplantierten Organe jedoch nur durch die Kombinationstherapie mit anti-CD3 mAk, CTLA-4-Immunglobulin oder anti-CD48 mAk erhalten werden konnte ^{125, 160, 161}. In den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen diente die Kombination des anti-CD2 mAk mit Dexamethason dazu, die Effektivität der CD2 gerichteten Therapie zu steigern. Wie die mit Ratten-IgG und Dexamethason behandelte Kontrollgruppe belegt, hat Dexamethason selbst in Form der intermittieren Stoßtherapie (alle 3 Tage) keinen Einfluss auf den Verlauf einer Transfercolitis. Ob dieses Glukokortikoid zu einer Modulation von CD2 führt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Beschrieben ist sowohl eine Inhibition ¹⁶² als auch eine Steigerung ¹⁶³ der CD2-Expression nach Dexamethason-Gabe. Wieder andere Autoren beobachteten keine Änderung der Expression von CD2 als Folge der Behandlung ¹⁶⁴. Bei der Behandlung etablierter Transfercolitis konnte die zusätzliche Applikation von Dexamethason die positiven Effekte des anti-CD2 mAk geringfügig unterstützen. Verantwortlich hierfür ist möglicher-weise nicht nur die Modulation transkriptionaler Ereignisse, sondern auch indirekt die Inhibition von IL-2 Rezeptor abhängigen Zytokinen durch Dexamethason ¹⁶⁵.

Da CD2 nicht nur funktionell ^{148, 166}, sondern auch strukturell mit CD3 verbunden ist ^{167, 168}, könnte eine Möglichkeit, die Effektivität des eingesetzten CD2 mAk 12-15 zu steigern, die Kombination mit einem anti-CD3 mAk sein. Chavin et al. beschreiben in ihren Versuchen zur Behandlung nach Transplantationen, dass eine Kombination dieser beiden Antikörper zu einem verlängerten Überleben der Tiere führt. Hierfür verantwortlich ist wahrscheinlich, dass die Kombination von CD2 und CD3 mAk zu einer Änderung der IL-2, IL-4, TNF- α und TGF- β Produktion führt, wodurch auch das CD3-assoziierte Zytokinsyndrom abgeschwächt wird ^{122, 145}. Da die aufgeführten Zytokine auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen von Bedeutung sind, könnte eine Kombinationstherapie die Wirkung der anti-CD2 gerichteten Behandlung unterstützen. Weiterführende Untersuchungen sollten sich außerdem damit befassen, welche Bedeutung die CD2-exprimierenden NK-Zellen haben. Denn beispielsweise für MEDI-507, einen humanisierten anti-CD2 Antikörper, der momentan in klinischen Phase I Studien getestet wird, wurde unter anderem die Apoptose-Induktion von NK-Zellen beschrieben ¹⁴³. Für den anti-CD2 mAk 12-15 ist dagegen bislang einzig bekannt, dass er in der Lage ist, NK-Zellantworten zu unterdrücken ⁹¹.

Zukünftige *in vitro*-Untersuchungen könnten außerdem Aufschluss darüber geben, ob akzessorische Zellen oder der Fc-Teil des Antikörpers bei der Modulation von CD2 über den anti-CD2 mAk 12-15 eine Rolle der spielen. Hinweise auf eine Beteiligung des Fc-Teils geben zum einen frühere Untersuchungen von Lin et al. ¹³⁷. Zusätzlich wurden Kreuzreaktionen zwischen dem Fc-Teil des untersuchten Antikörpers und Makrophagen beschrieben ¹³⁶. Eine Fc-Rezeptor-Abhängigkeit findet sich sowohl bei dem oben erwähnten MEDI-507 ^{169, 170} als auch bei Alefacept ^{171, 172}. Alefacept ist ein Ig-Fusionsprotein, das sich ebenfalls bereits in klinischen Studien befindet, und aus dem CD2-Liganden CD58 und einem Fc-Anteil besteht. Anders als der in dieser Arbeit an Mäusen untersuchte anti-CD2 mAk 12-15 wirkt Alefacept unter anderem durch eine selektive Apoptose von CD45RO⁺ Zellen (Übersicht in ¹⁰⁷).

Somit spiegelt dieses Fusionsprotein einen weiteren der vielen möglichen Wirkungsmechanismen einer CD2-gerichteten Immuntherapie wider.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den vorliegenden Versuchen eine CD2-gerichtete Immuntherapie auf Grund des schweren Verlaufes dieses Colitismodells die Mäuse weder vollständig vor einer Entzündung schützen, noch eine etablierte Colitis

heilen konnte. Allerdings gibt es Beispiele für andere Therapieansätze, die im Tiermodell weniger effektiv waren als beim späteren Einsatz im Menschen. Beispielsweise zeigte der erste Einsatz von anti-TNF- α -Antikörpern im murinen Transfercolitismodell³⁴ ähnliche Erfolge wie die hier untersuchte anti-CD2-gerichtete Therapie.

Anti-TNF- α -Antikörper werden heute beim Menschen erfolgreich zur Therapie von refraktärem Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis eingesetzt¹⁷³. Daher erscheint eine Therapie, die sich gegen CD2 richtet, ebenfalls Erfolg versprechend und sollte weiter verfolgt werden.

5.2 Einfluss von CD2 auf die perorale Infektion mit *T. gondii*

5.2.1 CD2 und die Kontrolle einer *T. gondii*-Infektion

Ein Problem der anti-TNF- α -Therapie wurde erst nach der Zulassung erkannt: Folge der Behandlung ist nicht nur eine effektive Blockade der Krankheitsaktivität, es können durch die Behandlung auch latente Infektionen (z.B. Tuberkulose) reaktiviert werden¹⁷⁴.

Aus diesem Grund sind Untersuchungen zur Infektabwehr unter anti-CD2-Therapie bereits im Vorfeld von immenser Bedeutung. Obwohl es sich bei dem Modell der Toxoplasmen-Infektion um kein streng T-Zell abhängiges Modell handelt, wurde es ausgewählt, da durch dieses Modell

1. Untersuchungen hinsichtlich der Infektabwehr durchgeführt werden können und
2. das Phänomen einer überschießenden Th₁-Immunreaktion einschließlich einer Ausbildung von Dünndarmnekrosen (Modell für Morbus Crohn) untersucht werden kann (siehe 5.2.2).

Die Beobachtung, dass eine Modulation von CD2 über anti-CD2 mAk zu keinem Anstieg der Parasitenzahlen und daher auch zu keiner erhöhten Infektanfälligkeit führt, ist daher von großer Bedeutung. Untersuchungen an WT-Mäusen, die oral mit *Toxoplasma gondii* infiziert wurden, belegen, dass Th₁-Zytokine (insbesondere TNF- α

und IFN- γ) für die Parasitenkontrolle benötigt werden^{48, 175}. Da eine Blockade der Th₁-Antwort gewöhnlich zu einer deutlichen Zunahme der Parasiten führt, zeigen die Versuche, dass die anti-CD2 gerichtete Therapie zumindest in diesem Mausmodell keine unspezifische Immunsuppression hervorruft.

Fasst man die Ergebnisse der hier untersuchten CD2-gerichteten Immuntherapie zusammen, wird durch sie im Verlauf einer Transfercolitis die Lymphozytenzahl reduziert, und es erfolgt eine Hemmung der IL-2 Produktion und/oder eine verringerte Lymphozytenproliferation. Es gibt jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise darauf, dass eine CD2-gerichtete Immuntherapie eine generalisierte und unerwünschte Immunsuppression bei einer Infektion mit *T. gondii* bewirkt.

Neben unerwünschten Effekten einer CD2-gerichteten Immuntherapie auf die Infektabwehr muss auch ein immunsuppressiver Einfluss einer solchen Therapie auf die Tumorabwehr ausgeschlossen werden. Denn obwohl CD2 defiziente Mäuse keine spontanen Tumore aufweisen, wurde in einer Studie beschrieben, dass es als Folge der Verabreichung des anti-CD2 mAk 12-15 zu einer generellen Unterdrückung der Tumor-Immunantwort kam⁶⁷. In diesen Versuchen, bei denen Mäusen Tumorzellen appliziert wurden, verhinderte die Gabe des anti-CD2 Antikörpers durch die Reduktion der zytotoxischen T-Zellantwort eine schützende Immunität. Die anti-CD2 mAk behandelten Mäuse starben innerhalb von 3 Wochen an der Ausbreitung der Tumorzellen. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Immunsuppression bei diesen beiden Modellen könnte sein, dass CD8⁺ T-Zellen, welche für die Generation einer zytotoxischen T-Zellantwort essentiell sind, zumindest für die Entstehung der *T. gondii* induzierten Parasitenbesiedelung keine Bedeutung haben⁴⁸.

Während durch die Modulation von CD2 über einen anti-CD2 mAk die Parasitenzahl im Ileum nicht gesteigert wurde und somit die CD2-Modulation in diesem Modell nicht mit einer geschwächten Infektabwehr einhergeht, zeigten CD2-defiziente Mäuse, die phänotypisch unauffällig sind¹¹⁸, 7 Tage nach Infektion mit *T. gondii* sogar signifikant niedrigere Toxoplasmentiter im Ileum als infizierte Wildtypmäuse. Dies ist besonders deshalb erstaunlich, weil generell bei CD2 defizienten Mäusen ein quantitativer Defekt in der Antigenerkennung beobachtet wurde¹⁷⁶. Dieser sollte eigentlich bewirken, dass

Zellen von CD2 defizienten Mäusen höhere Antigenkonzentrationen benötigen, um dieselben Reaktionen wie WT-Zellen zu zeigen. Passend zu den hier gefundenen Ergebnissen bei der murinen Toxoplasmose gibt jedoch die stattfindende Immunantwort CD2 defizienter Mäuse nach Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus oder auch mit *Pneumocystis carinii* keine Hinweise auf eine generelle Immunsuppression CD2 defizienter Mäuse^{177, 178}.

Die Ergebnisse der Untersuchung CD2 defizienter Mäuse lassen darauf schließen, dass CD2 an der Regulation einer Toxoplasmeninfektion direkt oder indirekt beteiligt ist.

5.2.2 CD2 und *T. gondii*-induzierte Dünndarmpathologie

Wie bereits erwähnt, weist eine murine Infektion mit *Toxoplasma gondii* im Gegensatz zu einer Toxoplasmeninfektion beim Menschen eine Immunpathologie auf, welche der des Morbus Crohn ähnelt. Bei den Versuchen zur Modulation über CD2 war das Überleben einer geringen Anzahl anti-CD2 behandelter, *T. gondii*-infizierter Mäuse gegenüber dem infizierter, unbehandelter WT-Tiere tendenziell verlängert ($p = 0,1$). Diese Ergebnisse lieferten einen ersten Hinweis darauf, dass CD2 möglicherweise auch für das *T. gondii*-induzierte Crohn-Modell von Bedeutung ist.

Die Untersuchungen an Toxoplasmen-infizierten CD2 defizienten Mäusen belegten diese ersten Vermutungen: CD2 defiziente Mäuse wiesen an Tag 7 nach Infektion einen geringeren Gewichtsverlust als die Wildtyp-Mäuse auf, überlebten signifikant länger, und zeigten auch histologisch eine signifikant geringere Entzündung des Ileums.

Da auch die Toxoplasmentiter im Dünndarm CD2 defizienter Mäuse verglichen mit WT-Mäusen geringer waren, nehmen diese Mäuse eine Sonderstellung der bislang am Toxoplasmen-Modell untersuchten Therapiekonzepte ein. Denn während IL-12 defiziente Mäuse 7 Tage nach Infektion zwar eine geringere Entzündung aufweisen als infizierte WT-Mäuse, wird das Überleben dieser Mäuse nicht beeinflusst, und im Darm finden sich als Ausdruck der Immunsuppression mehr Toxoplasmen als bei infizierten Kontrollmäusen¹⁷⁹. IL-18 defiziente Mäuse wiederum überleben eine Toxoplasmen-Infektion zwar länger als WT-Mäuse, aber eine Woche nach Infektion weisen sie in den Toxoplasmentitern keine und in der Entzündung nur geringe Unterschiede zu den

Kontrollmäusen auf ¹⁷⁹. Da ein Fehlen von CD2 nicht nur das Überleben, sondern auch die Entzündung und die Toxoplasmentiter im Dünndarm positiv beeinflusst, scheint dieses Molekül in den Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* besonders stark involviert zu sein.

Untersuchungen der Zytokine im Serum sowie im Überstand TLA-stimulierter Zellen der mLK an Tag 7 nach Infektion belegten signifikant geringere Spiegel an IFN- γ bei den CD2 defizienten Mäusen. Die hohe IFN- γ Produktion *T. gondii*-infizierter Wildtypmäuse ist ein charakteristisches Zeichen für dieses Crohn-Modell ^{48, 175}. Ähnlich finden sich auch bei Patienten mit Morbus Crohn erhöhte IFN- γ Spiegel ^{19, 180}.

Erstaunlich ist, dass sich bei CD3/CD28 stimulierten Splenozyten aus CD2 defizienten Mäusen signifikant höhere Spiegel an IFN- γ fanden als bei den Kontrolltieren. Dies hängt möglicherweise mit den verschiedenen Rollen zusammen, die IFN- γ im Verlauf einer murinen *T. gondii*-Infektion einnimmt: Während IFN- γ einerseits bei einer subletalen Infektion für das Überleben der Mäuse notwendig ist ^{181, 182}, vermittelt es bei letalen Infektionen die Immunpathologie im Darm und führt zum frühen Tod der Mäuse ⁴⁸. Die lokale Produktion von IFN- γ scheint in diesem Modell zu der Entstehung von Nekrosen zu führen: IFN- γ induziert gemeinsam mit TNF- α große Mengen an iNOS in inflammatorischen Zellen, wodurch es zur Synthese von Stickoxid kommt. Stickoxid wiederum ist verantwortlich für die typische Gewebeschädigung ¹⁷⁵. Somit ist wahrscheinlich die verringerte lokale IFN- γ Produktion CD2 defizienter Mäuse mitverantwortlich für den verzögerten Verlauf der *T. gondii*-Infektion.

Die Untersuchung des Zytokinprofils ergab außerdem eine ebenfalls signifikant verringerte IL-6 Produktion stimulierter Lymphozyten von CD2 defizienten Mäusen verglichen mit WT-Mäusen. Da eine Erhöhung der IL-6 Spiegel im Verlauf des Morbus Crohn beschrieben ist ^{131, 183, 184}, trägt möglicherweise auch die geringere IL-6 Synthese CD2 defizienter Mäuse dazu bei, dass die Tiere eine geringere Ausprägung der Erkrankung zeigen und länger überleben.

Obwohl auch die Spiegel von TNF- α im Serum und in den Exkrementen von Patienten mit Morbus Crohn erhöht sind ^{185, 186}, konnten in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Produktion dieser Zytokine keine Unterschiede zwischen den mit *T. gondii* infizierten WT- gegenüber den CD2 defizienten Mäusen festgestellt werden.

5.3 *In vitro*-Effekte humaner anti-CD2 mAk

Nachdem es möglich war, durch den murinen anti-CD2 mAk 12-15 den Verlauf einer chronischen Entzündung zu modulieren, sollten in einem weiteren Schritt humane anti-CD2 mAk ermittelt werden, die ebenfalls in der Lage sind, die T-Zellaktivierung über CD2 zu modulieren. Dazu wurde das inhibitorische Potential von 17 verschiedenen humanen anti-CD2 mAk an humanen sowie an Lymphozyten human CD2 transgener Mäusen getestet.

HuCD2tg Mäuse tragen funktionell aktives humanes CD2, und ermöglichen so einen Brückenschlag zwischen dem murinem Modell und dem humanem System. Dieses Modell bietet außerdem die Möglichkeit, *in vitro* gefundene Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen, ohne dass direkte Untersuchungen am Menschen erforderlich sind. Das weiter oben bereits erwähnte, im Menschen therapeutisch wirksame Alefacept konnte beispielsweise auch in huCD2tg Mäusen die T-Zellantworten inhibieren¹⁷².

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Versuche mit humanen anti-CD2 mAk belegen vor allem eine Hemmung der IFN- γ Synthese sowie der Proliferation.

Die Induktion von IL-2 nach *in vitro*-Stimulation humaner Lymphozyten (PBL und gereinigte CD4⁺ T-Zellen) war insgesamt so gering, dass eine Hemmung der Produktion von IL-2 nach Zugabe der verschiedenen anti-CD2 mAk nicht beobachtet werden konnte. Einzig bei der Verwendung von humanen LPL sah man eine signifikante Verringerung der IL-2 Synthese bei Zugabe eines anti-CD2 mAk (8E5).

Wie bereits ausgeführt, zeichnen sich *in vivo*-generierte anerge Zellen dadurch aus, dass sie nicht proliferieren und *ex vivo* unter anderem wenig IL-2 und IFN- γ produzieren¹⁵⁸. Insgesamt legen damit die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche mit humanen und huCD2tg Lymphozyten die Hypothese nahe, dass eine CD2-Modulation über humane anti-CD2 mAk möglicherweise ebenfalls zur Induktion einer partiellen T-Zellanergie führt.

Es ist bekannt, dass CD45RB^{high} T-Zellen nach Stimulation unter anderem große Mengen an IFN- γ produzieren¹⁸⁷. Daher ist die *in vitro* beobachtete Hemmung der IFN- γ Produktion stimulierter Lymphozyten durch die humanen anti-CD2 mAk von großer Bedeutung für zukünftig geplante Transferversuche mit huCD2tg CD45RB^{high} T-Zellen.

Es wurde zusätzlich das Potential der humanen anti-CD2 mAk untersucht, regulatorische T-Zellen zu induzieren. Analog zu den murinen und humanen *in vitro* Versuchen zur Hemmung von Proliferation und Zytokinsynthese wurden stimulierte Lymphozyten mit den zu testenden anti-CD2 mAk inkubiert. Wie bei den Untersuchungen mit dem murinen anti-CD2 mAk 12-15 fanden sich auch hier keine Hinweise auf eine Induktion regulatorischer T-Zellen. Drei der getesteten Antikörper (35.1, UMCD2, 8E5) senkten sogar die Expression von CD25. Da CD25 ursprünglich als ein Aktivierungsmarker beschrieben wurde, geben diese Ergebnisse weitere Hinweise darauf, dass durch anti-CD2 mAk die CD3 induzierte Stimulation von Lymphozyten inhibiert werden kann.

Insgesamt konnten durch diese *in vitro*-Versuche 5 humane anti-CD2 mAk (8E5, UMCD2, 35.1, CB219, YTH) identifiziert werden, die sowohl an verschiedenen humanen als auch an huCD2tg Lymphozyten zu einer besonders starken Hemmung der Proliferation sowie der IFN- γ Synthese führten. Aus diesen Gründen scheinen diese Antikörper besonders vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung einer humanen, CD2-gerichteten Immuntherapie zu sein.

5.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der murine anti-CD2 mAk 12-15 in der Lage ist, den Verlauf adoptiver Transfercolitis zu verbessern, bzw. zu verzögern, ohne die Infektabwehr gegen *T. gondii* zu beeinflussen. Außerdem konnte durch *in vitro*-Versuche an humanen Zellen und an Zellen human CD2tg (huCD2tg) Mäuse belegt werden, dass auch humane anti-CD2 mAk das Potential haben, chronische Entzündungen zu bessern.

Daher sollten in weiterführenden Untersuchungen CD45RB^{high} Zellen huCD2tg Mäuse auf immundefiziente Mäuse transferiert und diese Mäuse mit den humanen anti-CD2 mAk behandelt werden, die bei den *in vitro*-Versuchen zur stärksten Hemmung der Proliferation sowie der IFN- γ Synthese führten (8E5, UMCD2, 35.1, CB219, YTH).

Besonders erfolgsversprechend scheinen diese Ansätze auch deswegen zu sein, da in der Vergangenheit nicht nur gezeigt wurde, dass murines CD2 etwa 10 x schwächer an seinen Liganden bindet als humanes CD2¹⁸⁸, sondern *in vitro*-Studien mit blockierenden anti-CD2 mAk¹⁸⁹ bzw. CD2 defizienten T-Zellklonen¹⁹⁰ außerdem vermuten lassen, dass humane T-Zellen stärker von Interaktionen zwischen CD2 und seinen Liganden abhängig sind als murine¹⁶⁷. Somit könnte eine gegen CD2 gerichtete Immuntherapie beim Menschen weitaus wirkungsvoller sein, als dies im murinen Colitismodell der Fall ist.

Parallel dazu sollten Untersuchungen zur Infektabwehr nach einer Infektion mit Toxoplasmen (*T. gondii*) bzw. mit Listerien (*Listeria monocytogenes*) an huCD2tg Mäusen unter humaner anti-CD2 mAk Therapie erfolgen. Ziel dieser Versuche müsste sein, auch hier eine unspezifische Immunsuppression einer Therapie, die sich gegen CD2 richtet, auszuschließen.

Schließlich ist es unerlässlich, die Wirkung einer CD2 gerichteten Immuntherapie auf die Tumorabwehr zu untersuchen, da frühere Versuche eine Immunsuppression nach anti-CD2 mAk Behandlung beschreiben⁶⁷.