

6. ZUSAMMENFASSUNG:

Eine kontrollierte subkutane Infektion von Lewis-Inzuchtratten (LEW/han) mit $5 \cdot 10^7$ koloniebildenden Einheiten (kbE) pathogener Rotlaufbakterien (*Erysipelothrix rhusiopathiae*, Serovar 2, Stamm T28) führt zu einer schweren akuten Allgemeinerkrankung mit Gewichtsverlust und Polyarthritits gefolgt von einer chronisch-progredienten Polyarthritits. Im Verlaufe der akuten Erkrankung entwickeln diese Tiere gegen den Erreger (T28-Bakterien) hohe Antikörpertiter. Diese behalten sie auch in der chronischen Phase bei. Aus mehreren kranken Tieren war eine Reihe monoklonaler Ratten-IgM/ κ -Antikörper (mAk) entwickelt worden, die gleichermaßen gut an T28-Rotlaufbakterien binden können (RÖLLINGER 1987). Davon waren vornehmlich drei mAk (D9, E51, R117) auf ihre Wirkung *in-vivo* geprüft worden (BERNARD 1990; ZIESENIS et. al. 1991): Während der mAk D9 keine erkennbare Wirkung *in-vivo* zeigte, hatten zwei andere (mAk E51 und mAk R117) einen bemerkenswerten Einfluß: Sie waren in der Lage, in Lewis-Ratten (LEW/han) bei einmaliger rechtzeitiger Applikation vor der Infektion mit T28-Bakterien, Mechanismen zu induzieren, die diese Tiere zuverlässig vor allen akuten und chronischen Erscheinungen einer Rotlauferkrankung schützen.

Wurden die mAk E51 oder R117 den Ratten jedoch erst kurz (1-24 Std.) vor der Infektion appliziert oder nach einer Vorinkubation mit den T28-Bakterien gemeinsam mit diesen inokuliert, waren sie wirkungslos. Der durch diese mAk E51 oder R117 induzierte Schutz entspricht somit nicht den Kriterien einer passiven Immunisierung (ZIESENIS et. al. 1991).

Zur Charakterisierung dieser bisher unbekanntenen Schutzmechanismen wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichende Verlaufsuntersuchungen an Ratten mit und ohne Vorbehandlung mit einem der schutzinduzierenden mAk durchgeführt:

- densitometrische Auswertung elektrophoretisch aufgetrennter Serumproteine zur orientierenden Untersuchung auf subklinische Auswirkungen der E51-mAk-Applikation.
- Prüfung der Antikörperantwort der Ratte auf eine Infektion mit T28-Rotlaufbakterien und auf eine Reinfektion mit demselben Erreger im ELISA-Verfahren.
- Prüfung der *in-vivo*-Wirkung des mAks E51 auf die Antikörperbildung gegen ein Hapten-Träger-System (Fluoresceinisothiocyanat-Ovalbumin: FO).
- Untersuchung der E51-mAk-Wirkung in genetisch differenten Rattenstämmen.

Als wesentliche Ergebnisse und deren Bedeutung sind zu nennen:

Orientierende quantitative Untersuchung von Serumproteinen.

LEW/han-Ratten wurden mit dem E51-mAk (**E51-Gruppe**) oder mit Zellkulturmedium ohne mAk (**Infektionskontrollgruppe**) vorbehandelt. Fünf Tage danach bekam jedes Tier $5 \cdot 10^7$ kbE an T28-Rotlaufbakterien subkutan verabreicht. Anhand klinischer Parameter (Körpergewichtsentwicklung, Allgemeinbefinden, Entzündungszeichen) entwickelten alle Tiere der Infektionskontrollgruppe ab dem dritten Tag nach der Infektion alle Zeichen einer Rotlaufkrankung, während die Tiere der E51-Gruppe keine erkennbaren klinischen Reaktionen auf die Infektion zeigten.

Vergleichende quantitative Untersuchungen der Serumproteinfraktionen dieser beiden Tiergruppen boten weiterführende Hinweise: Während das Verhalten der Serumalbuminkonzentration dem klinischen Verlauf entsprach (Abfall bei Körpergewichtsverlust, also lediglich bei den Tieren der Infektionskontrollgruppe), zeigten auch die Tiere der klinisch unauffälligen E51-Gruppe mit einem temporären Anstieg ihrer β -Globulinkonzentration (Maximum an Tag

5 p. i.) eine subklinische Reaktion auf die Infektion mit T28-Bakterien. Anhand der α -Globulinkonzentrationen war zu erkennen, daß allein die Vorbehandlung mit E51-mAk zu einer signifikanten Senkung dieser Serumproteinkonzentration führte. Hieran konnte auch die Infektion mit T28-Bakterien nichts mehr ändern. Im Gegensatz dazu zeigte die γ -Globulinkonzentration lediglich bei den Tieren der Infektionskontrollgruppe einen deutlichen Anstieg, während sie bei der E51-Gruppe auf dem Ausgangsniveau verharrte.

Damit war gezeigt, daß in den klinisch inapparenten Tieren der E51-Gruppe sowohl die Vorbehandlung mit dem mAk E51, als auch die nachfolgende Infektion mit T28-Bakterien subklinisch nachweisbare Reaktionen auslösten. Von diesen Hinweisen wurde der ausbleibende Anstieg der γ -Globulinkonzentrationen der E51-Gruppe eingehender untersucht.

Entwicklung der Antikörperantwort gegen T28-Rotlaufbakterien.

LEW/han-Ratten der Infektionskontrollgruppe entwickeln im Zuge ihrer akuten Rotlauf-erkrankung hohe Antikörpertiter gegen T28-Rotlaufbakterien. Im Gegensatz dazu bilden LEW/han-Ratten, die durch die E51-mAk- oder R117-mAk-induzierte Mechanismen vor einer Erkrankung geschützt sind, nach Infektion mit T28-Bakterien weder IgM- oder IgG-Antikörper gegen Epitope von T28-Bakterien.

Damit war gezeigt, daß mit der Induktion und der Aktivierung von Mechanismen, die einen effizienten Schutz gegen T28-Rotlaufbakterien vermitteln, die Ausbildung spezifischer Antikörper gegen diese Bakterien vollständig unterbunden wurde. Der Schutz vor dem Angehen der Infektion beruht offensichtlich auf antikörperunabhängigen Mechanismen. Ob der Infektionsschutz und die ausbleibende Antikörperbildung gekoppelte oder unabhängige Mechanismen darstellen, ist derzeit noch ungeklärt. Jedenfalls erwiesen sich die beiden mAk E51 und R117 als gleichwertig, indem sie sowohl eine Rotlauf-erkrankung als auch jede Antikörperbildung gegen T28-Bakterien unterbinden konnten.

Wurden LEW/han-Ratten, die nach Vorbehandlung mit E51-mAk und anschließender Infektion mit T28-Bakterien gesund blieben und keine Antikörper gegen die Infektionserreger bildeten (E51-Gruppe), sechs Monate nach der Erstinfektion ohne erneute E51-mAk-Vorbehandlung mit $5 \cdot 10^7$ kbE T28-Rotlaufbakterien reinfiziert, so blieben wiederum alle klinischen Symptome aus und eine erregerspezifische Antikörperbildung beschränkte sich auf eine

temporäre (14-tägige) geringfügig IgM-Antwort, der keine IgG-Antikörperbildung gegen T28-Rotlaufbakterien folgte. Dies spricht für ein beachtliches langanhaltendes immunologisches Gedächtnis, das sowohl für den Schutz vor dem Angehen einer erneuten Rotlaufinfektion als auch für das Ausbleiben einer IgG-Antwort sorgt. Zudem weist eine primäre IgM-Antwort bei ausbleibender IgG-Antwort gegen T28-Bakterien auf regulative immunsuppressive Mechanismen hin.

Derartige Schutz- und Regulationsmechanismen sind auch bei chronisch kranken LEW/han-Ratten (Infektionskontrollgruppe) zu vermuten: Sechs Monate nach Erstinfektion zeigten diese Tiere nach Reinfektion mit $5 \cdot 10^7$ kbE T28-Bakterien weder einen "akuten Krankheitsschub" noch einen Anstieg ihrer IgG-Antikörperspiegel gegen T28-Bakterien, obwohl sie ähnlich den reinfizierten Tieren der geschützten E51-Gruppe eine temporäre IgM-Antwort gegen T28-Bakterien entwickelten. Demnach könnten sich Mechanismen, wie sie sich durch die mAk E51 und R117 induzieren lassen, auch im Zuge einer Rotlauferkrankung ausbilden. Ob dafür die im Krankheitsverlauf entstehenden IgM-Antikörper erforderlich sind, bleibt noch zu klären.

Um zu prüfen, ob die E51-mAk-Vorbehandlung alleine ausreicht, längerfristig wirksame Schutzmechanismen zu induzieren, wurden LEW/han-Ratten statt nach fünf Tagen sechs Wochen nach der E51-mAk-Vorbehandlung erstmalig einer T28-Infektion ausgesetzt. Diese Tiere prägten alle Erscheinungen einer akuten und chronischen Rotlauferkrankung aus. Demnach scheint zusätzlich zu der Vorbehandlung mit dem mAk E51 die Auseinandersetzung mit T28-Bakterien für die Entwicklung der induzierten und langanhaltenden Mechanismen notwendig zu sein.

Entwicklung der Antikörperantwort gegen ein Hapten-Träger-System (FO: Fluorescein-isothiocyanat-Ovalbumin).

Mit dem Ziel, die Auswirkung einer E51-mAk-Vorbehandlung auf ein definiertes und mit Epitopen auf T28-Bakterien nicht kreuzreagierendes Hapten (FITC: Fluorescein-isothiocyanat) zu prüfen, wurden *in-vivo*-Untersuchungen mit einem Hapten-Träger-System (FO: Fluorescein-isothiocyanat-Ovalbumin) durchgeführt. Durch die Vorbehandlung mit dem mAk E51 konnte in LEW/han-Ratten eine signifikante Reduktion, jedoch keine vollständige

Hemmung der IgG-anti-FITC-Antikörperantwort auf eine Immunisierung mit FO induziert werden. Diese Reduktion war unabhängig von einer gleichzeitigen Infektion mit T28-Bakterien.

Tiere, die erfolgreich durch eine E51-mAk-Gabe vor einer nachfolgenden T28-Infektion geschützt waren, wurden drei Monate später ohne eine erneute E51-mAk-Vorbehandlung erstmalig mit FO immunisiert. Diese Ratten antworteten ebenfalls mit einer deutlich verminderten IgG-anti-FITC-Antikörperbildung.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß im Zuge einer Vorbehandlung mit dem mAk E51 immunregulative Mechanismen induziert werden, die abhängig vom Antigen zu einer partiell reduzierten (anti-FITC-) oder zu einer vollständig supprimierten (anti-T28-) Antikörperantwort führen. Wenn diese Mechanismen einmal durch ein Antigen "in Anspruch genommen" wurden (durch T28-Bakterien), so blieben sie auch für ein nicht kreuzreagierendes Antigen (FO) über mindestens drei Monate wirksam.

Wirkung von E51-mAk in genetisch differenten Rattenstämmen.

Da alle bislang gewonnenen Erkenntnisse aus Versuchen in genetisch praktisch identischen Tieren eines Ratteninzuchtstammes (LEW/han) stammten, wurde geprüft, ob sich durch eine E51-mAk-Vorbehandlung vergleichbare Mechanismen auch in genetisch von LEW/han-Ratten (I-Haplotyp) verschiedenen Stämmen induzieren lassen.

Nicht vorbehandelte Long-Evans-Ratten (uv2-Haplotyp) erkrankten akut nach der Infektion mit *E. rhusiopathiae*, Stamm T28, und starben alle binnen sieben Tagen p.i.. Sie entwickelten hohe erregerspezifische IgM-Antikörperspiegel. Demgegenüber waren E51-mAk-vorbehandelte Long-Evans-Ratten zuverlässig vor den Folgen einer T28-Infektion geschützt und ließen sowohl eine IgM- als auch eine IgG-anti-T28-Antikörperantwort gegen T28-Bakterien missen. Im Gegensatz zu LEW/han- und Long-Evans-Ratten zeigten *rmu/rmu*-Ratten (c-Haplotyp) eine weitgehende "natürliche" Resistenz gegenüber T28-Bakterien. Diese Tiere erkrankten weder mit noch ohne E51-mAk-Vorbehandlung. Auch zeigte keines der infizierten Tiere eine IgM- oder IgG-Antwort gegen T28-Bakterien. Ob bei diesen Tieren vergleichbare Mechanismen, wie sie bei LEW/han- und LE-Ratten durch die E51-mAk-Vorbehandlung erst induziert werden, bereits ausreichend aktiv waren, oder ob diese Tiere aufgrund ihrer Defizienz an α , β -

T-Lymphozyten ein Angehen der Infektion und die Bildung erregerspezifischer Antikörper verhinderten, bleibt noch zu klären.

Zumindest für die Stämme LEW/han und Long-Evans kann gesagt werden, daß sie prinzipiell über ausreichende Resistenzmechanismen verfügen, die sie jedoch allein nicht genügend zu entwickeln vermögen, um gegenüber einer Infektion mit T28-Bakterien "natürlicherweise" resistent zu sein. Diese Mechanismen können mit dem mAk E51 in genetisch unterschiedlichen Tieren wirkungsvoll induziert oder aktiviert werden. Damit dürften die bei LEW/han-Ratten untersuchten Mechanismen auch für Individuen unterschiedlicher Genetik relevant sein.

7. SUMMARY:

PETERMANN, M. (1994):

"Characterization of *in-vivo*-effects of monoclonal antibodies in rats with experimental erysipelas infection"

Upon an experimental subcutaneous infection with $5 \cdot 10^7$ colony forming units (cfu) of T28-bacteria (*Erysipelothrix-rhusiopathiae*, Serovar 2, strain T28) inbred LEW/han-rats develop a severe acute systemic erysipelas disease with loss of bodyweight and polyarthritis followed by a chronic and progressive polyarthritis. During the acute phase of illness the animals generate high titres of antibodies against T28-bacteria, which are maintained in the chronic phase. From diseased animals several monoclonal rat-IgM/ κ -antibodies (mab) were produced equally binding to epitopes of T28-bacteria (RÖLLINGER 1987). Three mabs (D9, E51, R117) were investigated *in-vivo* (BERNARD 1990; ZIESENIS et al. 1991): When applied once in time before the infection with T28-bacteria, two of them (E51, R117) were able to induce powerful defence mechanisms in LEW/han-rats, protecting the animals from both acute as well as chronic erysipelas, while under the same conditions the mab D9 did not show any effect.

In contrast, when the mabs E51 and R117 were applied either shortly (1-24 h) before the infection or after having been preincubated with the T28-bacteria, they were not able to cause protection.

Therefore the characteristics of this mab-induced protection are markedly different from those of a passive immunization.

In order to characterize these protecting mechanisms follow up studies were performed comparing R117- or E51-mAb-pretreated rats with non-pretreated ones. They comprised:

- Densitometry analysis of serum proteins separated by electrophoresis in order to monitor subclinical effects of the mAb-pretreatment;
- ELISA-studies on the antibody response to an infection and to a reinfection with T28-bacteria;
- Analysis of the *in-vivo*-influence of the mAb E51 on the IgG-response to a hapten-carrier-system (FO: Fluoresceinisothiocyanate-ovalbumin);
- Investigation of the role of E51-mAb-pretreatment in genetically different inbred rat strains;

The following main results were obtained:

Quantitative studies of serum protein fractions.

LEW/han-rats were pretreated with the mAb E51 (**E51-group**) or with mAb-free cell culture medium (**infection control**). Five days after pretreatment each animal was infected subcutaneously with $5 \cdot 10^7$ cfu of T28-bacteria. While all rats of the infection control completely developed full blown erysipelas disease two days after infection, the E51 group showed no clinical signs of infection, by means of generalized disorders, loss of body weight, signs of inflammation.

Further characterization was permitted by comparing these groups in regard to the development of serum protein concentrations:

A loss of serum-albumine in parallel to the loss of body weight occurred in the infection control only. However, while clinically unaffected, the animals of the E51-group reacted subclinically to the infection with T28-bacteria with a transient increase of their β -globulins (max. d5 p. i.). In addition, a significant decrease of the α -globulin-concentration in sera was

caused by E51-mab-pretreatment on its own. Even subsequent infection with T28-bacteria was not able to alter the reduced α -globulin-level. E51-mAb-pretreatment additionally inhibited an increase in the concentration of γ -globulins upon infection with T28-bacteria, which was observed in erysipelas-diseased rats.

Therefore it could be demonstrated that in the protected animals (E51-group) both the E51-mAb-pretreatment as well as the infection caused significant subclinical serum reactions. The lack of increase of the γ -globulin concentration was studied in more detail.

Development of the antibody response to T28-Erysipelas-bacteria

In contrast to erysipelas-diseased animals (infection control) which develop high antibody titres to T28-bacteria LEW/han-rats being protected from erysipelas by E51-mAb- or R117-mab induced mechanisms (E51-group) produced neither IgM- nor IgG-anti-T28-antibodies at any time after infection.

Therefore the mab-mediated induction or activation of efficiently protecting mechanisms is accompanied by a complete suppression of an antibody response to any of the detectable T28-bacteria epitopes. Evidently these mechanisms of protection to T28-infection are antibody independent. Whether these mechanisms of protection and the suppression of an antibody response are linked remains unclear. However, the mabs E51 and R177 appear to be functionally equivalent as both are capable to induce protection as well as suppression of the antibody production.

LEW/han-rats, which had been protected by E51-mAb-pretreatment and did not develop any anti-T28-antibody response, were reinfected after six month with $5 \cdot 10^7$ cfu of T28-bacteria. Again these animals remained clinically unaffected and showed only a weak and transient (14 days) IgM-anti-T28-response, but no switch of the antibody production to IgG.

This indicates that an immunological memory was active able to protect these animals from reinfection and to inhibit an IgG-response. The observed primary IgM-response without subsequent IgG-response may be indicative of regulatory immune-suppressive mechanisms.

Similar mechanisms are presumed to be also active in chronically diseased LEW/han-rats (infection control): These animals being reinfected with $5 \cdot 10^7$ cfu of T28-bacteria six month after the first infection did not show any exacerbation of the disease. They also did not

exhibit a secondary IgG-antibody-response (increase of the IgG-anti-T28-antibody level), but showed only a transient IgM-anti-T28-response lasting 14 days. Mechanisms, which can be induced by E51-mab- and R117-mab-pretreatment, may thus develop during the course of an erysipelas disease. Whether IgM-antibodies produced in response to the infection do induce these mechanisms in diseased animals, is still unknown.

In order to learn whether E51-mAb-pretreatment itself is sufficient to induce memory mechanisms for protection, LEW/han rats received infection six weeks after the pretreatment instead of five days as in the previous experiments. All of these animals developed a classical acute and chronic erysipelas disease.

Therefore in addition to the induction by the E51-mAb-pretreatment infection with T28-bacteria appears to be indispensable for the development of protecting and memory mechanisms.

Development of the IgG-antibody response to a hapten-carrier-system (FO: Fluoresceine-isothiocyanate-chicken-egg-albumin).

To investigate the effect of E51-mAb-pretreatment on the IgG-antibody response to a defined hapten (FO: FLuoresceine-isothiocyanate), which does not cross-react with epitopes of T28-bacteria, *in-vivo* studies using a hapten-carrier-system (FO: Fluoresceine-isothiocyanate-ovalbumin) were performed. In LEW/han-rats the IgG-antibody response to the hapten FITC was significantly but only partially reduced by E51-mAb-pretreatment. This reduction was independent of a simultaneous infection with T28-bacteria.

Animals which had been protected from a subsequent erysipelas infection by application of E51-mAb were immunized with FO three months later. Again these rats showed a partially reduced IgG-antibody response to FITC.

These results indicate that E51-mAb-pretreatment induces immunoregulatory mechanisms which in dependence of the antigen cause a partial reduction (anti-FITC-response) or a complete suppression (anti-T28-response) of the specific antibody response. Once induced (by E51-mab) and developed with participation of an antigen (T28-bacteria) these mechanisms remain active for at least three months regulating even a non cross-reacting antigen (FO).

Effect of the E51-mab-pretreatment in genetically different inbred rat strains.

All results obtained from experiments on LEW/han-rats are based on immunological events in genetically identical animals. Therefore the capacity of the mab E51 to induce comparable mechanisms in inbred rat strains differing genetically from LEW/han-rats (I-haplotype) was studied.

Non-pretreated Long-Evans-rats (uv2 haplotype) infected with T28-bacteria died within seven days post infection suffering from a severe acute illness. During that they produced high levels of IgM-anti-T28-antibodies. However, Long-Evans-rats pretreated with E51-mAb were reliably protected from erysipelas and produced neither IgM- nor IgG-antibodies to T28-bacteria.

In contrast to LEW/han- and Long-Evans-rats, *rmu/rnu*-rats (c haplotype), independently of E51-mAb-pretreatment appeared to be almost resistant to T28-bacteria without showing a T28-specific IgM- or IgG-antibody response. Whether mechanisms similar to those induced in LEW/han- and Long-Evans-rats by E51-mAb-pretreatment were already sufficiently active in *rmu/rnu*-rats, or whether in these animals lack of an antibody response and of clinical signs to infection with T28-bacteria are related to their α,β -T-cell deficiency, remains still unknown.

At least in LEW/han- and Long-Evans-rats efficient mechanisms of resistance are existent, even though these rat strains themselves are not able to induce or activate them on their own. By E51-mAb-pretreatment, however, these mechanisms can be induced or activated in genetically different rat strains. Therefore, the mechanisms studied in LEW/han-rats appear to be of importance for individuals with different genetical outfit.