

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

MAX.16H5 ist ein monoklonaler Antikörper gegen humanes CD4. Sein Einsatz in der Rejektionstherapie befindet sich in der klinischen Erprobung. Mit kurzen prophylaktischen anti-CD4-Antikörpergaben kann man im Tiermodell das Immunsystem des Transplantatempfängers so beeinflussen, daß es langfristig nicht auf die Präsentation der allo genen Zellstrukturen des Transplantatspenders reagiert. Dies scheint mit einer selektiven Unterdrückung der Sekretion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-2 (IL-2), d.h. von Typ-1-Zytokinen gegenüber der unveränderten Sekretion des Typ-2-Zytokins Interleukin-4 (IL-4) einher zu gehen. Die Beobachtung einer entsprechenden Beeinflussung des T-Zell-Zytokin-Sekretionsmusters wurde die Erprobung analoger prophylaktischer Antikörpertherapien vor der Transplantation beim Menschen nahelegen.

Für die Abstoßungsreaktion ist die Reaktivität der T-Zellen nach deren Erkennung von allo genen Zellstrukturen ein wichtiger Faktor, die sich *in vitro* in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) untersuchen läßt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit des monoklonalen anti-CD4 Antikörpers MAX.16H5 auf die T-Zell-Antworten in verschiedenen Varianten der MLC zu untersuchen.

In der primären MLC werden die T-Zellen durch deren erstmalige Erkennung von präsentierten allo genen Zellstrukturen aktiviert, in der sekundären durch deren erneute Alloanti genenerkennung. In der primären Zweiweg-MLC allogener peripherer mononukleärer Zellen des Blutes (PBMC) werden die allo genen Zellstrukturen hauptsächlich durch allo gene dendritische Zellen (DC) präsentiert. Alternativ können sie auch in einer primären Einweg-MLC durch bestrahlte allo gene Zellen von lymphoblastoiden B-Zelllinien (B-LCL) präsentiert werden. In den verschiedenen MLCs wurden phänotypische Änderungen enthaltener T-Zell-Subpopulationen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zellproliferation wurde mittels der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation in neusynthetisierte DNA quantitativ beurteilt. Die Expression von IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4 wurde auf der Ebene der mRNA-Spiegel mit einer kompetitiven Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (kompetitive RT-PCR) quantifiziert und als freigesetztes Zytokin im Kulturüberstand mit enzymgebundenen Immunadsorptionstests (ELISA) geprüft.

Die Untersuchungen zeigten folgende Ergebnisse: Im Verlauf der primären Zweiweg-MLC stieg innerhalb der T-Zellen der Anteil CD8 exprimierender T-Zellen (CD8+ T-Zellen) an. Sowohl CD4 exprimierende T-Zellen (CD4+ T-Zellen) als auch CD8+ T-Zellen zeigten eine höhere Oberflächenexpression der „Aktivierungsmarker“ CD25 und CD11a. Die Zellproliferation stieg um mehr als das 20-fache. Die mRNA-Spiegel der T-Zell-Zytokine vom Typ-1 (IFN- $\gamma$  und IL-2) stiegen um den Faktor 20-100 an, während sich die Spiegel IL-4-mRNA nur verdoppelten. Auf der Ebene freigesetzten Zytokins im Kulturüberstand zeigten sich ähnliche Verschiebungen beim IFN- $\gamma$  und IL-4. Die IL-4-Konzentrationen stiegen zwar auf das Dreifache der ELISA-Nachweisgrenze, doch überstiegen diese Meßwerte, verglichen mit dem beobachteten Anstieg des IFN- $\gamma$ , nur sehr wenig die Nachweisgrenzen.

In Ansätzen der primären Zweiweg-MLC führte zugesetzter monoklonaler anti-human-CD4 Antikörper MAX.16H5 in Konzentrationen von mehr als 0,4 mg pro ml zu einer Sättigung der Antikörper-Bindung des CD4-Molekuls. MAX.16H5 reduzierte dosisabhängig die Oberflächenexpression von „Aktivierungsmarkern“ auf CD4+ T-Zellen mehr als auf CD8+ T-Zellen. Schon Konzentrationen von 0,004 mg pro ml reduzierten statistisch signifikant die Proliferation und die Zytokin-Expression (mRNA-Spiegel und Freisetzung) der Typ-1-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2. Eine vollständige Unterdrückung war aber auch in Anwesenheit von 40 mg pro ml nicht zu erreichen. MAX.16H5 hatte zwar auch eine hemmende Wirkung auf die Expression des IL-4 (Typ-2-Zytokin), doch eine quantitative Analyse dieses Effekts war aufgrund der geringen Überschreitung der Nachweisgrenzen in den untersuchten Kultursystemen nicht möglich.

Die oben beschriebenen T-Zell-Antworten zeigten sich in vergleichbarer Form auch in der primären Einweg-MLC, in der alternativ B-LCL-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen verwendet wurden.

In der sekundären MLC hatten die T-Zell-Antworten einen anderen zeitlichen Verlauf als in der primären MLC, zeigten sonst aber keine deutlichen qualitativen Unterschiede im Hinblick auf eine Verschiebung der T-Zell-Antwort mit starker Typ-1-Zytokinexpression zugunsten einer stärkeren Typ-2-Zytokinexpression. MAX.16H5 behinderte die T-Zell-Antworten aktivierter T-Zellen in der sekundären MLC, allerdings mit einer noch geringeren Wirksamkeit als in der primären MLC.

Abschließend läßt sich festhalten, daß allogene stimulierte T-Zell-Antworten in Anwesenheit des monoklonalen Maus-anti-human-CD4-Antikörpers MAX.16H5 sowohl in der primären als auch in der sekundären MLC zwar reduziert, aber keinesfalls vollständig unterbunden wurden. Die Wirkungen waren unabhängig von der stimulierenden Zellpopulation nachweisbar, welche allogene Strukturen präsentierte. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von MAX.16H5 qualitativ und quantitativ nachgewiesen anhand der Oberflächenexpression von „Aktivierungsmarkern“, der Proliferation und der T-Zell-Zytokin-Expression von Typ-1-Zytokinen (IFN- $\gamma$  und IL-2). Die Reduktion der Typ-2-Zytokinexpression konnte nur qualitativ, aber nicht quantitativ bestimmt werden.

Die vermutete und im experimentellen Rattenmodell gezeigte Toleranzinduktion durch monoklonale anti-CD4-Antikörper in Form einer gehemmten IFN- $\gamma$ -Sekretion bei unveränderter oder verstärkter IL-4-Sekretion konnte durch den hier eingesetzten monoklonalen anti-human-CD4-Antikörper MAX.16H5 weder in primären noch in sekundären MLC Ansätzen erreicht werden.

Jan Koesling

**Impairment of the T-cell response in mixed lymphocyte culture by the monoclonal anti-CD4 antibody MAX.16H5**

MAX.16H5 is a monoclonal antibody against human CD4. Clinical trials are presently carried out in order to establish its capacity in anti-rejection therapy following solid organ transplantation. In animal models, short term prophylactic administration of anti-CD4-antibodies prior to allogeneic transplantation resulted in long-term suppression of recipient alloreactivity. There is evidence that this is due to a selective suppression of secretion of type-1-cytokines such as interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-2 (IL-2), while the secretion of the type-2 cytokine interleukin-4 (IL-4) remains unchanged. If, indeed, analogous modulation of the T-cell cytokine secretion pattern were observed in humans, further investigation into the prophylactic use of anti-CD4 therapy prior to transplantation would be warranted.

Rejection is mainly due to T cell reactivity following the recognition of allogeneic structures (alloantigens) which can be studied *in vitro* in mixed lymphocyte cultures (MLC). The purpose of this investigation was to study the impact of MAX.16H5 on T-cell responses in a variety of MLC

Primary MLC assays employ T cells that have not previously encountered the appropriate alloantigen. In contrast, assays utilising T cells previously activated by alloantigen are termed secondary MLC. In the primary bidirectional MLC of allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMC) alloantigens are mainly presented by allogeneic dendritic cells. Alternatively, alloantigen can be presented by irradiated allogeneic B-lymphoblastoid cell lines (B-LCL) in a primary unidirectional MLC. In these culture systems phenotypic changes in various T cell subpopulations were examined by flow cytometry. Cell proliferation was quantitatively assessed by  $^3\text{H}$  thymidine incorporation into newly synthesised DNA. The expression of IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 was studied at the mRNA transcript level by competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction (competitive RT-PCR) and at the protein level by measuring secreted cytokines in culture supernates using sandwich ELISA systems.

These studies revealed the following results: In primary bidirectional MLC the proportion of T cells expressing CD8 (CD8+ T cells) increased, while both, CD4 expressing T cells (CD4+ T cells) and CD8+ T cells showed increased expression of CD25 and CD11a, which are considered to be markers of T cell activation. Cell proliferation increased about twenty-fold. Messenger-RNA levels of the type-1 T cell cytokines, IFN- $\gamma$  and IL-2, increased by a factor between 20 and 100, while the mRNA-level of the type-2 cytokine, IL-4, merely doubled. Quantification of cytokine concentrations within the culture supernate revealed a similar shift for IFN- $\gamma$  and IL-4 levels, however, the concentrations of IL-4 only exceeded the ELISA test threshold about three-fold, exhibiting a much lower exceed than that observed when measuring IFN- $\gamma$  concentrations in the culture supernate.

A concentration of 0.4 mg per ml of the anti-CD4 monoclonal antibody, MAX.16H5, used in primary bidirectional MLC, was sufficient to effect saturation of surface CD4 molecules by means of indirect immunofluorescence and flow cytometry. The presence of MAX.16H5 in primary bidirectional MLC dose-dependently reduced the expression of T cell „activation markers“ with the effect on CD4+ T cells being greater than that on CD8+ T cells. Proliferation and type-1 cytokine expression (IFN- $\gamma$  and IL-2) were reduced in a statistically significant way at MAX.16H5 concentrations exceeding 0.004 mg per ml. Complete suppression, however, was never achieved, even at concentrations of 40 mg per ml. MAX.16H5 had an inhibitory effect on IL-4 gene expression (mRNA transcription as well as protein secretion into the culture supernate). This effect could not reliably be quantified because IL-4 levels were too close to the detection threshold in all culture systems.

Essentially the same results as above were obtained in unidirectional MLC when B-LCL cells were used as antigen presenting cells.

In secondary MLC the T cell responses were faster than in the primary bidirectional MLC, however, they did not show any obvious qualitative differences like a shift from a predominant expression of type-1 cytokines towards an increased expression of type-2 cytokines. MAX.16H5 was able to reduce the T cell responses in the secondary MLC as well, although the effect was even less than in primary MLC.

In summary, these results indicate that the monoclonal mouse anti-human-CD4 antibody MAX.16H5 can reduce the T cell responses in primary and secondary MLC although it failed to fully suppress them. The type of antigen presenting cells used in the system made no difference to the effectiveness of MAX.16H5. In this study the expression of T cell „activation markers“, T cell proliferation, and expression of T cell cytokine genes for IFN- $\gamma$  and IL-2 were examined qualitatively and quantitatively. The culture systems used were not suitable for quantitative studies regarding the IL-4 gene expression.

Experiments in rats had revealed that the induction of tolerance after treatment with monoclonal anti-CD4 antibodies was achieved by a selective inhibition of IFN- $\gamma$  secretion while IL-4 secretion remained unchanged or even increased. Though expected in the human system, comparable results could not be obtained when the effect of MAX.16H5 was studied in primary and secondary MLC.