

6. SUMMARY

The outcome of experimental infection of rats with *Erysipelothrix rhusiopathiae* (strain T28, serovar 2) can vary from an acute fatal disease to a symptomless course, depending upon the genetic constitution of the host. Some strains of rats (e.g. Lewis) develop an acute polyarthritis followed by a chronic form resembling human rheumatoid arthritis (RA). T cells are considered to play a critical role in the pathogenesis of RA. This has been well established in several animal models for RA. However, the role of T cells in *E. rhusiopathiae* induced arthritis remains largely unknown. The present study, therefore, intended to investigate the role of T cells expressing the $\alpha\beta$ -T-cell antigen receptor ($\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells) in *E. rhusiopathiae* induced diseases in rats.

The mouse monoclonal antibody R73 (mAb R73), specific for the $\alpha\beta$ -T cell receptor ($\alpha\beta$ -TCR) of rats was used to modulate $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells *in vivo*. The effect of the mAb R73 treatment on different peripheral blood lymphocyte subsets of rats was tested by indirect membrane immunofluorescence and flow cytometry. Experiments were conducted: to work out the modalities for an efficient *in vivo* modulation of $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells using the mAb R73; to study the nature of the mAb R73 induced modulation; and, to investigate the effects of such modulation on the development of *E. rhusiopathiae* induced disease, and vice versa, in rats. Two different types of responses to the mAb R73 treatment of rats were observed, depending upon their duration they were named 'short-' or 'long-term responses'.

The short-term response was characterised by a drastic disappearance (from 50-65% to <10%) of peripheral blood T cells expressing $\alpha\beta$ -TCR at high density ($\alpha\beta$ -TCR^{high} T cells) within 24 hours of subcutaneous (s.c.) administration of 1ml of the mAb R73 preparation. The disappearance of $\alpha\beta$ -TCR^{high} T cells was partly or completely compensated by T cells expressing $\alpha\beta$ -TCR at low density ($\alpha\beta$ -TCR^{low} T cells). The disappearance of $\alpha\beta$ -TCR^{high} T cells was also associated with a partial and transient disappearance of T cell expressing CD3 or CD4 at a high density (CD4^{high} cells). Whereas CD8⁺ and CD16⁺ cells showed a slight increase, the level of CD45⁺ cells remained almost unaltered. Thus, the mAb R73 induced short-term response appeared to constitute a down-regulation of certain molecules from the

cell surface but not the physical depletion of the cells bearing these molecules. The $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells returned spontaneously to normal levels within about 2 weeks. The recovery could not be inhibited by repeated administration of the mAb at intervals of 1, 2 or 3 days.

The re-treatment with a single dose of the mAb R73 of rats, with fully recovered $\alpha\beta$ -TCR⁺ cells, led to the development of a 'long-term response'. The response of rats to such a second (secondary) or third (tertiary) treatment was designated as 'secondary-' or 'tertiary-response', respectively. The secondary response was delayed in onset (by about 5 days) but the disappearance of all of the $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells was stronger, longer, and more stable as compared to a primary response. A tertiary treatment induced most efficient disappearance of $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells for at least 20 weeks. As this long term disappearance of $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells was accompanied by a selective disappearance of CD4⁺ and CD8⁺ lymphoid cells but normal levels of lymphocytes expressing CD3, Thy 1 or the $\gamma\delta$ -TCR it had to be due to down regulation of the lacking surface molecules rather than to depletion of such cells. Moreover, it was considered unlikely that 2 or 3 doses of the mAb R73 given at intervals of several weeks could directly act for such a long time of disappearance of $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells. Therefore, the hypothesis that the mAb R73 might induce the production of anti-anti-idiotypic antibodies (Ab3) *in vivo*, mimicking the specificity and biological action of the mAb R73, was tested. It could be shown that IgG in the sera harvested from rats in a state of long term $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cell disappearance could bind to mononuclear cells from normal rats, and also inhibited the subsequent binding of the mAb R73. Thus, these observations indicate that anti-anti-idiotypic antibodies induced in the host by secondary or tertiary treatment with the mAb R73 may be the major factors responsible for efficient and long term down-regulation of $\alpha\beta$ -TCR and related T cell molecules.

The infection with *E. rhusiopathiae* (strain 28, serovar 2) of Long Evans (LE) rats, in a state of long-term disappearance of their $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells, led to a normal course of the disease in these animals. The status of the $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells in the infected animals also remained unaltered. Thus, the infection in LE rats seems not to be influenced by the state of down regulation of the $\alpha\beta$ -TCR on T cells. Similarly, the infection of Lew/Han rats, in the state of long-term disappearance of T cells, showed normal development and progression of

polyarthritis. Vice versa, the infection could not in general alter the state of disappearance of $\alpha\beta$ -TCR^{hi} T cells. Thus, the development and progression of polyarthritis induced by *E. rhusiopathiae* (strain T28, serovar 2) in rats seems to be independent of the expression of $\alpha\beta$ -TCR on T cells.

Conclusively, the mAb R73 can successfully be used to induce a potent, stable and long lasting down-regulation of the expression of $\alpha\beta$ -TCR, CD4 and CD8 on rat T cells. The *E. rhusiopathiae* (strain T28, serovar 2) induced diseases in rats develop independent of the expression of $\alpha\beta$ -TCR on T cells.

7. ZUSAMMENFASSUNG

MIR, Shams-u-Din (1997):

„Untersuchungen zur Rolle der T-Zellen bei der experimentellen Rotlaufkrankung der Ratte“

Eine experimentelle Infektion mit 5×10^7 koloniebildenden Einheiten (kBE) *Erysipelothrix rhusiopathiae* Bakterien, Serovar 2, Stamm T28 führt bei Inzuchtratten in Abhängigkeit von ihrem Stamm zu Erkrankungsmustern, welche von einer akut-letalen Erkrankung bis zur Resistenz der Tiere variieren. Lewisratten entwickeln nach einer solchen Infektion zunächst eine Allgemeinerkrankung und akute Polyarthrit, welche nachfolgend von einer chronisch progredienten Polyarthrit abgelöst wird. Diese chronisch progrediente Rotlaufpolyarthrit der Ratte ist der Rheumatoiden Arthritis (RA) des Menschen in vielen Parametern vergleichbar und konnte als Tiermodell für diese etabliert werden. In anderen Tiermodellen für die Rheumatoide Arthritis sowie in der Rheumatoiden Arthritis selbst wird T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese zugeschrieben. Die Rolle der T-Zellen in der experimentellen Rotlaufinfektion der Ratte ist jedoch noch weitgehend ungeklärt und sollte daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Als Mittel hierzu stand ein monoklonaler Mäuse - IgG1 - Antikörper (mAb R73) mit Spezifität für den $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor ($\alpha\beta$ -TCR) der Ratte zur Verfügung. Er sollte zur selektiven *in-vivo*-Modulation von $\alpha\beta$ -TCR⁺ T-Zellen eingesetzt werden. Der mAb R73 wurde als Zellkulturüberstand durch Kultivierung des R73-Hybridoms in einem Kleinfementersystem (MiniPerm[®] Fa. Heraeus) gewonnen. Die fluoreszenzzytometrische Messung der Bindung des mAb an mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut der Ratte (PBMC) diente zur Ermittlung der Konzentration an funktionsfähigem mAb R73 im Überstand sowie zur Standardisierung der Überstände für den Einsatz *in vivo* und *in vitro*. Die Separation von PBMC wurde durch Zentrifugation gerinnungsgehemmten Vollblutes über einen Percoll[®] Dichtegradienten (Fa. Pharmacia) erreicht. Die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle auf verschiedenen PBMC-Subpopulationen wurde nach indirekter Membranimmunfluoreszenzmarkierung ebenfalls im Durchflußzytofluorometer gemessen.

Zuerst wurde versucht, geeignete Bedingungen für einen wirkungsvollen Einsatz des mAb R73 zur *in-vivo*-Modulation der $\alpha\beta$ -TCR⁺ T-Zellen zu finden. Anschließend war das Wesen der durch den mAb R73 induzierten Modulation zu charakterisieren. Letztlich wurde geprüft, wie sich eine mAb R73 induzierte Modulation der $\alpha\beta$ -TCR⁺ T-Zellen auf den klinischen Verlauf der experimentellen Rotlaufinfektion der Ratte auswirkt.

In der Literatur beschriebene Arbeiten über den *in-vivo*-Einsatz des mAb R73 basieren auf intravenöser oder intraperitonealer Verabreichung des mAb R73. In den vorliegenden Untersuchungen erwies sich die subkutane Applikation als funktionell gleichwertig. Die vergleichende Applikation eines mAb IL-A111 mit irrelevanter Spezifität (gegen den bovinen IL-2-Rezeptor) aber gleichem Isotyp (Maus IgG₁) bewies die Abhängigkeit der Modulation von der Spezifität des mAb R73. Eine einmalige subkutane Gabe von 1 ml unverdünntem oder 1:10 in Zellkulturmedium verdünntem standardisiertem mAb R73-haltigem Zellkulturüberstand führte innerhalb von 24 Stunden zu einer drastischen Verminderung von $\alpha\beta$ -TCR⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Diese Verminderung (von 50-65% auf <10 %) von stark $\alpha\beta$ -TCR exprimierenden Zellen ($\alpha\beta$ -TCR^{high} T-Zellen) wurde teilweise oder vollständig durch eine Zunahme schwach $\alpha\beta$ -TCR exprimierender Zellen ($\alpha\beta$ -TCR^{low} T-Zellen) kompensiert. Weiterhin waren bis zum sechsten Tag nach einmaliger mAb R73 Applikation noch PBMC nachweisbar, die den mAb R73 an der Oberfläche gebunden hatten. Innerhalb von zwei Wochen erholten sich die Tiere spontan von der mAb R73 induzierten Verminderung von $\alpha\beta$ -TCR⁺-T-Zellen im peripheren Blut. Auch wiederholte Applikationen des mAb R73 in Abständen von 1, 2, oder 3 Tagen konnten diese Rückkehr zum Ausgangsniveau der $\alpha\beta$ -TCR⁺-T-Zellen nicht verhindern. Die so erreichte kurzfristige Modulation durch den mAb R73 wird hier als „short-term-response“ beschrieben.

Um das Wesen der short-term-response besser zu verstehen, wurde vergleichend die Auswirkung einer einmaligen mAb R73 Applikation auf verschiedene Subpopulationen der PBMC fluoreszenzzytometrisch untersucht. Mit der beschriebenen Verminderung $\alpha\beta$ -TCR⁺-T-Zellen ging eine Verminderung von CD4^{high} Zellen und CD3⁺ Zellen einher. Dem stand eine geringe Verstärkung der Populationen an CD8⁺ und CD16⁺ Zellen gegenüber, was für eine Kompensation sprechen könnte. Da aber keine Verminderung der CD45⁺ Zellpopulation

festzustellen war, scheint die durch den mAb R73 induzierte Modulation der $\alpha\beta$ -TCR' T-Zellen weniger auf einer physischen Depletion dieser Zellen zu beruhen, sondern eine Herunterregulation der Expression der betroffenen Oberflächenmoleküle zu bedeuten.

Werden Ratten, welche eine „short-term-response“ gezeigt hatten, nach der vollständigen Erholung des Blutbildes einer erneuten Behandlung mit dem mAb R73 unterzogen, so zeigen sie eine längerfristige Modulation der $\alpha\beta$ -TCR'-T-Zellen. Diese wird hier „long-term-response“ genannt. Die zweite Behandlung (secondary treatment; nach der „short-term-response“) führt zur „secondary response“, die dritte Behandlung (tertiary treatment; nach der „secondary-response“) führt zur „tertiary response“. Eine zweite mAb R73 Behandlung von Ratten, die im ersten Experiment durch eine oder mehrere Dosen des mAb R73 eine „short-term-response“ entwickelt hatten, zeigte, daß es möglich war, durch den mAb R73 erneut eine Verminderung der $\alpha\beta$ -TCR' T-Zellen zu induzieren. Im Gegensatz zur „short-term-response“ trat diese Verminderung erst verzögert nach 5 Tagen ein, war aber deutlicher und hielt länger an. Dabei war diese „secondary response“ bei den Tieren, welche im ersten Experiment nur eine Dosis des mAb R73 bekommen hatten, sogar noch stärker ausgeprägt als bei denen, die bei der Erstbehandlung in kurzen Zeitabständen wiederholt mAb R73-Dosen bekommen hatten. Am effizientesten erwies sich eine dritte Behandlung. Die so induzierte „tertiary response“ begann ebenfalls etwa 5 Tage verzögert und zeigte dann für mindestens 20 Wochen ein nahezu vollständiges Verschwinden aller $\alpha\beta$ -TCR' T-Zellen, der $\alpha\beta$ -TCR^{hi} wie der $\alpha\beta$ -TCR^{lo} T-Zellen. Dabei zeigte keines der Tiere eine Beeinträchtigung seines Wohlbefindens.

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, mit welchem zeitlichen Abstand nach der ersten Applikation des mAb R73 eine zweite oder dritte Behandlung mit dem mAb R73 durchgeführt werden müßte, um eine „long-term-response“ zu erreichen. Hierzu wurde vergleichend die zweite Behandlung mit dem mAb R73 zwei, drei, vier oder sieben Wochen nach der ersten Behandlung angesetzt. In den letzten drei Gruppen kam es zu einer Reduzierung der $\alpha\beta$ -TCR' T-Zellen. Diese war jedoch mit zunehmendem Zeitabstand zur ersten Behandlung ausgeprägter. Um eine effiziente „long-term response“ zu induzieren, ist jedoch ein Zeitabstand von sieben oder mehr Wochen nötig.

Zur weiteren Charakterisierung der „long-term response“ wurden nach Induktion einer „tertiary response“ Messungen einer Reihe von Oberflächenmarkern ($\alpha\beta$ -TCR, $\gamma\delta$ -TCR, CD3, CD4, CD8, CD16, CD45, Thy.1, und sigM) 28, 42, und 142 Tage nach der dritten Behandlung mit dem mAb R73 durchgeführt. Mit der Reduktion $\alpha\beta$ -TCR'-Zellen ging auch eine drastische Verminderung der Expression von CD4, CD8 und CD16 Molekülen einher. Letzteres zeigte sich jedoch nur auf Zellen, die CD16 in relativ hoher Dichte exprimieren (CD16^{high}). Gleichzeitig war aber die Expression von CD3, CD45 und Thy.1 Molekülen unbeeinflusst. Dies spricht erneut und eindeutig für eine Herunterregulation der Expression der „verschwundenen“ Oberflächenmoleküle ($\alpha\beta$ -TCR, CD4, CD8) und gegen eine physischen Depletion der sie tragenden Zellen.

Zur Erklärung dieser langfristigen Modulation der $\alpha\beta$ -TCR' T-Zellen (bis über 20 Wochen) erschien eine direkte Wirkung des mAb R73 nicht tragfähig. Jedoch könnte die Applikation des mAb R73 zur Induktion von anti-antiidiotypischen Antikörpern in der Ratte führen, welche die Spezifität und biologische Wirkung der initial verabreichten mAb R73 haben. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß Seren von Ratten, welche eine „long-term-response“ entwickelt hatten, IgG-Antikörper enthielten, die an PBMC unbehalteter Ratten binden. Mit diesen Seren konnte eine Bindung des mAb R73 an PBMC der Ratte spezifisch inhibiert werden. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß die im Rahmen der „long-term-response“ entstehende drastisch verminderte Expression von $\alpha\beta$ -TCR auf die Bildung von anti-antiidiotypischen Antikörpern zurückzuführen ist.

Die beschriebene Modulation der $\alpha\beta$ -TCR' T-Zellen durch eine mAb R73 induzierte „long-term-response“ wurde schließlich eingesetzt, um die Rolle der $\alpha\beta$ -TCR' T-Zellen in der experimentellen Rotlaufinfektion der Ratte zu untersuchen.

In zwei Gruppen von Long-Evans-Ratten (LE) wurden durch mAb R73 Applikationen eine „long-term-response“ induziert. Anschließend wurden diese Tiere einer klinischen oder einer subklinischen Infektion mit *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Serovar 2, Stamm T28 ausgesetzt. Durch keine der beiden Infektionen wurde die Herunterregulation des $\alpha\beta$ -TCR aufgehoben.

Weder die klinische noch die subklinische Infektion zeigte sich in ihrem Verlauf durch die Modulation der T-Zellen beeinflusst.

In einem weiteren Experiment wurden LEW/Han Ratten (Lewis) während einer bestehenden „secondary response“ mit 5×10^7 kbE *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Serovar 2, Stamm T28 infiziert. In der Entwicklung der akuten und chronischen Rotlaufkrankung unterschieden sich diese Tiere nicht von der Infektionskontrollgruppe. Ebenso konnte die Infektion nicht die Expression des herunterregulierten $\alpha\beta$ -TCR beeinflussen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß mittels des monoklonalen Antikörpers R73 eine sehr potente, stabile, und lang andauernde Herunterregulation der Expression der Oberflächenmoleküle $\alpha\beta$ -TCR, CD4 und CD8 auf T-Zellen induziert werden kann. Durch Einführung dieser mAb R73 induzierten Regulation in das Modell der experimentellen Rotlaufinfektion der Ratte konnte festgestellt werden, daß diese in ihrem klinischen Verlauf unabhängig von der Expression von $\alpha\beta$ -TCR auf T-Zellen ist