

6. Zusammenfassung

Als "Superantigene" bezeichnete Moleküle aus Bakterien, Mykoplasmen oder Viren können das Immunsystem bei Mensch und Labormägern über einen MHC-Klasse II-vermittelten Wirkungsmechanismus beeinflussen, der dem der klassischen Antigenpräsentation ähnelt, aber erhebliche immunregulative Bedeutung hat. Superantigene sollen selektiv MHC-Klasse II-Moleküle als Liganden benutzen, um dann mit bestimmten T-Zellrezeptoren in Interaktion zu treten.

Als Grundlage für die Frage nach der möglichen pathogenetischen Bedeutung von *Staphylococcus aureus*-Superantigenen beim Rind wurden in dieser Arbeit zunächst prinzipielle zelluläre Reaktionen boviner mononukleärer Blutzellen nach *in vitro* Stimulation mit verschiedenen, definierten Superantigenen von *Staphylococcus aureus* (SEA, SEB, SEE) untersucht.

Für die Messung von Proliferationsreaktionen wurde ein durchflußzytometrisches Verfahren für das Rind adaptiert (Referenzzellmethode). Es erlaubte die Bestimmung absoluter und relativer Zellzahlen (getrennt nach Zysten und Blasten) und korrelierte gut mit der üblicherweise eingesetzten Messung des Einbaus radioaktiven ³H-Thymidins. Die Referenzzellmethode ermöglichte überdies in Kombination mit der indirekten Membranimmunfluoreszenz Aussagen über Proliferations- und Absterbecharakteristika einzelner zellulärer Subpopulationen.

In vitro erwiesen sich alle geprüften Superantigene gegenüber bovinen mononukleären Blutzellen als funktionell aktiv. Die maximale Stärke der durch ein bestimmtes Superantigen induzierbaren Proliferationsreaktion variierte tierindividuell. Anhand charakteristischer sigmoidaler Dosis-Wirkungs (% vitale Zellblasten)-Beziehungen wurden proliferationsinduzierende Potenzen einzelner Superantigene bestimmt. Effektive Superantigenkonzentrationen, die nach 6 Tagen 80% der maximal erreichbaren Blastogenese hervorriefen (Kon_{80}), lagen bei großen interindividuellen Schwankungen zwischen 0,8-1,3 pg/ml (SEE), 4,6-78 pg/ml (SEA) und 0,193-16,22 ng/ml (SEB). Damit war SEE 5-60fach wirksamer als SEA und SEA wiederum 22-200fach wirksamer als SEB. Alle blastisch transformierten Zellen bestanden zu über 95% aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und slg⁺ B-Lymphozyten.

Für bovine B-Lymphozyten schienen Grenzwertkonzentrationen der einzelnen Superantigene zu existieren. Unterhalb der jeweiligen Konzentration kam es zur konstanten Proliferation und Vermehrung dieser Zellen. Oberhalb der Konzentration wurden sie nach initialer Proliferation zwischen Tag 4 und 6 der *in vitro* Kultur

nahezu vollständig eliminiert. Für SEE konnten erhebliche interindividuelle Unterschiede (bis zum 50fachen) der Grenzwertkonzentration beobachtet werden.

Charakteristisch für das Rind und für alle geprüften Superantigene war die präferentielle Expansion von CD8⁺ gegenüber CD4⁺ T-Lymphozyten. Im Gegensatz zu anderen Spezies (Maus, Mensch) kam es zu einem konstanten Abfall des CD4 / CD8-Quotienten im Verlauf der *in vitro* Kultur. Während dies bei SEA und SEE fortschreitend für alle geprüften Konzentrationen galt, führten niedrige Konzentrationen von SEB (1 ng / ml) zwischen Tag 4 und 6 zu einem erneuten Anstieg des CD4⁺/CD8⁺-Verhältnisses, verglichen mit einem überproportionalen Abfall durch hohe Konzentrationen SEB (100 ng / ml). Kinetische Zellzahlanalysen und ein antikörperbasierter Hemmungsversuch belegten, daß die schwächere Proliferation von CD4⁺ T-Zellen für das Abfallen des CD4⁺/CD8⁺-Verhältnisses verantwortlich war und nicht auf eine gesteigerte Zytolyse über einen CD11a/CD18-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus zurückgeführt werden konnte.

Zwischen verschiedenen Superantigenen und deren Konzentrationen beobachtete Unterschiede der zellulären Reaktionen konnten u.a. auf einer differentiellen Induktion von Mediatoren in antigenpräsentierenden Zellen beruhen. Daher wurde im folgenden untersucht, ob differentiell superantigeninduzierten Monozyten- / Makrophagenmediatoren (Stickstoffmonoxid, NO und Prostaglandin E₂, PGE₂) ein regulativer Einfluß auf diesen Parameter und die Proliferationsreaktion insgesamt zukommt.

Die NO-Produktion boviner mononukleären Zellen *in vitro* nach Superantigenstimulation wurde indirekt durch Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturüberstand mit Hilfe des Griess-Reagenz ermittelt. Die NO-Produktion nach Stimulation korrelierte mit dem Monozytengehalt der Ausgangszellpopulation und lag bei geringen Unterschieden zwischen den Superantigenen zwischen 0,31 - 1,04 µmol / l NO₂ / 10³ CD14⁺ Monozyten. Deutliche Unterschiede konnten zwischen den geprüften Tieren festgestellt werden. Interindividuelle Unterschiede in den Proliferationscharakteristika nach Stimulation mit den Superantigenen waren jedoch nicht auf individuell unterschiedliche Kapazitäten der NO-Produktion zurückzuführen. Weder die Hemmung der endogenen NO-Synthese, noch die Zugabe eines NO-Donor-Reagenz ließen qualitative oder quantitative Effekte dieses Mediators auf die bisher geprüften zellulären Parameter der Aktivierung und Proliferation beim Rind erkennen. Die regulative Kapazität des NO unterscheidet sich damit deutlich zwischen dem Rind und anderen Spezies wie Mensch, Maus und Ratte. Demzufolge haben NO-vermit-

telte Mechanismen wahrscheinlich für die Modulation proliferativer Reaktionen beim Rind, im Gegensatz zu anderen Spezies, keine besondere Bedeutung.

Die PGE₂-Produktion boviner mononukleärer Zellen *in vitro* nach Superantigenstimulation wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISA gemessen. Die durch SEA und SEB dosisabhängig induzierte PGE₂-Produktion mit Maximalwerten zwischen Tag 2 und 4 der Kultur ($0,35\text{-}2,4 \times 10^{-4}$ mol / l pro 2×10^5 Zellen) war mit erheblicher interindividueller Variabilität behaftet. Die Hemmung der PGE₂-Synthese durch Indomethacin führte bei einigen Tieren zu einer z.T. erheblich gesteigerten (um 150-350%) Proliferationsreaktion nach Superantigenstimulation. Ebenso unterschiedlich erwiesen sich Rinder in ihrer 'Empfindlichkeit' gegenüber der proliferationshemmenden Wirkung exogen zugegebenem PGE₂. Überdies konnte beim Rind eine dichotome PGE₂-Wirkung (proliferationsfördernd und -hemmend) in verschiedenen Konzentrationsbereichen nachgewiesen werden. Keinen Einfluß zeigte PGE₂ auf die Expressionskinetik und -stärke von Aktivierungsmolekülen (CD25, MHC-Klasse II). Beide untersuchten Mediatoren, NO und PGE₂, waren nicht für die präferentielle CD8⁺-T-Zellproliferation beim Rind verantwortlich zu machen. Somit konnte für das PGE₂ gezeigt werden, daß individuelle Unterschiede in der Kapazität der superantigeninduzierten PGE₂-Produktion sowie individuelle Unterschiede in der Sensitivität der Zellen gegenüber PGE₂ zur interindividuellen Variabilität der Stärke proliferativer Reaktionen nach der Stimulation mit SEA und SEB beitragen.

In der Summe unterschieden sich einzelne Superantigene, ihre lokalen Konzentrationen und Einzeltiere bezüglich der induzierten qualitativen und quantitativen Zellantworten *in vitro*. Superantigen-vermittelte Effekte auf bovine mononukleäre Zellen sind somit nicht in linearer Art und Weise dosisabhängig und lassen sich demnach in verschiedener Hinsicht nicht für die Spezies Rind generalisieren. Welche neben den hier charakterisierten Faktoren, Mediatoren oder Mechanismen noch entscheidend für das Schicksal boviner mononukleärer Zellen *in vitro* und *in vivo* nach Superantigeninteraktion sind, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

7. Summary

Anke Hendricks: **Functional Characterisation of the Interaction between Bacterial Superantigens and Bovine MHC class II Molecules.**

Molecules produced by bacteria, mycoplasma or viruses and referred to as „superantigens“ can influence the immune system of man and rodents via a MHC class II mediated mechanism similar to that of conventional antigen presentation. Superantigens are of considerable immunoregulatory significance because they selectively interact with MHC class II molecules and T-cell antigen receptors.

With regard to the potential pathogenetic role of staphylococcal superantigens in the bovine species, this study investigates characteristic reactions of bovine peripheral blood mononuclear cells (boMNC) following *in vitro* stimulation with defined *staphylococcus aureus* superantigens (SEA, SEB, SEE).

To assess proliferation a flow cytometric method was established for use in cattle (reference cell method), permitting the determination of absolute and relative cell numbers (resting cells and blasts). The method applied correlated well with the standard method of quantifying the incorporation of radioactive ³H-Thymidin. Furthermore, in combination with indirect membrane immunofluorescence the reference cell method rendered it possible to investigate characteristics of proliferation and cell death of distinct cellular subpopulations.

In vitro all superantigens tested were functionally active when exposed to boMNC. The maximum of the proliferative response induced by a certain superantigen varied interindividually. By means of characteristic, sigmoid dose-response (% viable blast cells) curves the stimulatory potential of the superantigens was determined. Superantigen concentrations inducing 80% of the maximally inducible blastogenesis (Conc₈₀) after 6 days *in vitro* ranged between 0.8-1.3 pg/ml (SEE), 4.6-78 pg/ml and 0.193-16.22 ng/ml (SEB). Thus, in inducing blastogenesis in boMNC SEB was 5-60 times more potent than SEA, and SEA was 22-200 times more potent than SEB. Over 95% of the blast cell population were CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes and sIg⁺ B-Lymphocytes.

For bovine B-lymphocytes threshold concentrations below which B-cells continuously proliferated were determined. Above these threshold concentrations B-cells, following initial proliferation, were almost completely eliminated from culture between day 4 and 6. With SEE considerable interindividual differences regarding this threshold (up to 50 times) could be observed.

The preferential expansion of CD8⁺ T-lymphocytes rather than CD4⁺ cells proved characteristic for the bovine species and all superantigens tested. In contrast to other species (mouse, man) the ratio of bovine CD4⁺/CD8⁺ cells continuously decreased during *in vitro* culture. Whereas this was true for all concentrations of SEA and SEE tested, between day 4 and 6 low concentrations of SEB (1 ng / ml) led to an increase of the ratio, compared to an extreme decrease of the ratio with high concentrations (100 ng / ml) of SEB. The analysis of cellular dynamics as well as an antibody-based inhibition experiment revealed that reduced proliferation of CD4⁺ cells - and not a CD11a/CD18 mediated cytotoxic mechanism - was responsible for the decrease of the CD4⁺/CD8⁺ ratio.

The differences of cellular reactivity between different superantigens and their concentrations might have been caused by a differential induction of mediators in antigen presenting cells. Therefore, it was investigated whether the induction of monocyte / macrophage mediators, such as nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂, PGE₂) had any regulatory impact upon the preferential expansion of CD8⁺ cells and the proliferative response in general.

The NO production of boMNC following superantigen stimulation *in vitro* was assessed indirectly by measuring the amount of nitrite in supernates using the Griess method. NO production following stimulation correlated with the initial number of monocytes present in culture and, with little differences between superantigens, ranged between 0.31-1.04 $\mu\text{mol} / \text{l NO}_2^- / 10^5 \text{ CD14}^+$ monocytes. Distinct differences were observed between the animals tested. However, interindividually different proliferative reactions following superantigen stimulation could not be attributed to individually different capacities of NO production. Neither the inhibition of NO synthesis nor the addition of a NO donor revealed any qualitative or quantitative effects of this mediator upon the parameters of activation and proliferation tested in cattle. Thus, the regulatory role of NO in cattle clearly differs from that of other species, such as man, mouse and rat. Therefore, NO mediated mechanisms are not likely to be of any significance for the modulation of bovine proliferative responses.

In vitro PGE₂ production of boMNC following superantigen stimulation was measured using a competitive ELISA. The dose-dependent production of PGE₂ with maximum values between days 2 and 4 of culture ($0.35\text{-}2.4 \times 10^{-8} \text{ mol} / \text{l per } 2 \times 10^5$ cells) was accompanied by a considerable interindividual variability. The inhibition of PGE₂ synthesis by indomethacin in some animals led to an increased proliferative reaction (about 150-350%) following superantigen stimulation. The sensitivity of individual cattle regarding the inhibitory effects of exogenous PGE₂ proved to be just as variable. Furthermore, contrary effects (enhancement and inhibition of prolifera-

tion) were detected for different concentrations of PGF_2 . No impact of PGE_2 was found on the expression kinetics and density of activation markers such as MHC class II and / or CD25. Neither NO nor PGF_2 could be held responsible for the preferential proliferation of CD8^+ T-cells in cattle. Thus, it was demonstrated that individual differences of the superantigen-induced PGE_2 -producing capacity as well as individual differences in the sensitivity to PGE_2 can contribute to the interindividual variability of proliferative responses following stimulation with SEA and SEB.

In conclusion, various superantigens, their concentrations and single animals appeared to differ quantitatively and qualitatively regarding the cellular *in vitro* responses. Superantigen mediated effects on boMNC are not dose-dependent in a linear manner and - in various respects - cannot be generalised for the bovine species. It remains to be investigated which factors, mediators and mechanisms other than the ones characterized in this study may determine the fate of bovine mononuclear cells *in vitro* and *in vivo* following superantigen interaction.