

Aus der Hautklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
(Direktorin: Frau Professor Dr. I. Moll)

Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28 und  
ihrer Korrelation zu atopischen und autoimmunen Erkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Hedwig Franziska Gergely  
aus Darmstadt  
Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg am: 14.07.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Augustin

Prüfungsausschuss: 2. Gutachterin: PD Dr. Esther Coors

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Nolte

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 T-Zell-Aktivierung und Costimulation	8
1.1.1 Aktivierung und Stimulation der T-Zelle	8
1.1.2 Costimulation allgemein	10
1.2 CD28 - ein costimulatorisches Molekül	11
1.2.1 Costimulation durch CD28	11
1.2.2 Struktur und Vorkommen von CD28	12
1.2.3 B7-1 und B7-2 - die Liganden von CD28 und CTLA-4	13
1.2.4 Die Funktionen von CD28	13
1.2.4.1 Allgemeine Funktionen	13
1.2.4.2 Spezielle Funktionen von CD28	15
1.2.4.3 Signalwege von CD28	16
1.2.5 CD28 als Regulator in Toleranz und Autoimmunität	16
1.2.6 CD28 und Anergie	17
1.3 CTLA-4 - der Gegenspieler von CD28	18
1.4 Atopische Erkrankungen	20
1.4.1 Atopie allgemein	20
1.4.2 Atopische Dermatitis	21
1.4.2.1 Diagnosekriterien	21
1.4.2.2 Formen der Atopischen Dermatitis	21
1.4.2.3 Histologie	22
1.4.2.4 Pathophysiologie	22
1.4.3 Allergisches bronchiales Asthma	26
1.5 Aufgabenstellung	27

<b>2.</b>	<b>Patienten, Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1	Nachweisen des Vorkommens von Autoantikörpern gegen CD28 durch Western-Blotting im Serum von Probanden	28
2.1.1	Proteinspaltung mit Trypsin	28
2.1.2	SDS-Page ( <i>Sodium-dodecyl-sulphate-polyacrylamide-gel-electrophoresis</i> )	28
2.1.3	Blotting	31
2.1.4	Immunoprinting	32
2.1.5	Auswertung der Immunoblots	34
2.2	Statistische Analyse	35
2.3	Proliferationsassay zum Nachweis der Stimulation von T-Lymphozyten durch humane Anti-CD28-Autoantikörper in einem Modell der Anergie	35
2.3.1	Herstellung der Poolseren	35
2.3.2	Reinigung der CD28-Autoantikörper aus den Poolseren	35
2.4	Gemischte lymphozytäre Reaktion	36
2.5	Patienten und Kontrollpersonen	37
2.6	Material	38
2.6.1	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel	38
2.6.2	Verwendete Geräte	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Ergebnisse des Immunoblots	40
3.1.1	Bestimmung der geeigneten Menge Chimäremischung pro Blotspur	40
3.1.2	Western-Blotting als geeignete Methode zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28	40

3.1.3	Auswertung der Western-Blotting-Ergebnisse	41
3.2	Statistische Auswertungen	42
3.2.1	Korrelation der Autoantikörper gegen CD28 hinsichtlich Alter und Geschlecht	42
3.2.2	Assoziationen der Autoantikörper gegen CD28 zu verschiedenen Erkrankungen	43
3.2.3	Logistische Regressionsanalyse der Faktoren, die Autoantikörper gegen CD28 beeinflussen	44
3.3	Testungen der immunologischen Relevanz der Anti-CD28-Autoantikörper	45
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Diskussion der Fehlermöglichkeiten	47
4.2	Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28	48
4.3	Autoantikörper gegen CD28 und Atopie	49
4.4	Autoantikörper gegen CD28 bei autoimmunen Erkrankungen	51
4.5	Auswirkung der Autoantikörper gegen CD28 in einem Modell der Anergie	53
4.6	Zusammenspiel der Anti-CD28-Autoantikörper und CTLA-4 Bei atopischen und autoimmunen Erkrankungen	54
4.7	Schlussfolgerungen	56
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>

<b>7.</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>84</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>85</b>
<b>10.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>86</b>

## 1. Einleitung

Eine zentrale Eigenschaft des Immunsystems ist seine Fähigkeit, zwischen körpereigenen und fremden Antigenen unterscheiden zu können. Funktionell kompetente Lymphozyten sind imstande, fremde Antigene zu erkennen und dagegen zu reagieren, während Autoantigene nicht erkannt werden und auch keine Immunreaktion auslösen.

Das Ausbleiben einer spezifischen Immunantwort auf Antigenstimulation wird immunologische Toleranz genannt. Ein Verlust dieser Autotoleranz ermöglicht Immunreaktionen gegen körpereigene (autologe) Antigene. Derartige Reaktionen sind unter dem Begriff der Autoimmunität oder der Autoimmunreaktionen bekannt. Die durch Autoimmunreaktionen verursachten Krankheiten werden als Autoimmunkrankheiten bezeichnet<sup>1 (S.452)</sup>.

Autoantikörper gegen Oberflächenmoleküle an Lymphozyten wurden bereits bei verschiedenen Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen und Infektionen sowie bei Bluttransfusionen beschrieben<sup>2,3</sup>. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Anwesenheit dieser *Antilymphocyte Antibodies* (ALA) und der Krankheitsaktivität<sup>4</sup>, einer Lymphopenie<sup>5</sup>, einer Verschiebung der Lymphozytenuntergruppen<sup>6,7</sup> sowie den Abweichungen der Funktion bei T-Zellen, B-Zellen und Monozyten<sup>8,9,10</sup> beobachtet werden. Bislang konnten nur wenige Zielstrukturen der ALA bei Menschen (CD45,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und HLA-Klasse-I-Moleküle<sup>11,12,13,14</sup>) und bei Tieren (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4)<sup>15</sup>) identifiziert werden. In dieser Arbeit gelang es erstmalig, Autoantikörper gegen CD28 nachzuweisen. Die zentrale Rolle dieses costimulatorischen Moleküls und seines Gegenspielers CTLA-4 mit deren Liganden B7-1 und B7-2 in der Zellimmunität wurde bislang gut untersucht. Einerseits liegt ihre Funktion in Freisetzung stimulierender Signale, was u.a. zur Unterstützung der T-Zell-Proliferation und Immunantwort führt. Durch inhibitorische Signale andererseits gelingt es, durch sie T-Zelltoleranz und Anergie wesentlich zu beeinflussen und zu kontrollieren. Ferner spielen sie eine Rolle in der Homöostase und Funktion suppressiver Zellen, der regulatorischen T-Zellen (Tregs), die ihrerseits in der Zelltoleranz von erheblicher Bedeutung sind.

## 1.1 T-Zell-Aktivierung und Costimulation

### 1.1.1 Aktivierung und Stimulation der T-Zelle

Bei der Aktivierung von T-Lymphozyten entstehen Effektorzellen, die mit intrazellulären Erregern infizierte Zellen abtöten, andere Zellen des Immunsystems wie Makrophagen oder B-Lymphozyten aktivieren oder Zytokine produzieren. Die adaptive Immunantwort wird aber häufig nicht dort ausgelöst, wo ein Krankheitserreger einen Infektionsherd hervorruft, sondern in den peripheren lymphatischen Organen<sup>16 (S.1072)</sup>. Naive T-Zellen zirkulieren im Blut, in der Milz und in anderen lymphatischen Geweben, aber sie können diese Kompartimente nur verlassen und in periphere nicht-lymphatische Gewebe und Organe auswandern, wenn sie aktiviert sind. Antigene, die nur in der Peripherie exprimiert werden, d.h. außerhalb vom Thymus und peripheren sekundären lymphatischen Organen, werden von T-Zellen ignoriert<sup>17 (S.50)</sup>.

Die Aktivierung naiver T-Lymphozyten erfolgt, indem sie auf ein Fremdanigen treffen, das sie mit Hilfe ihres individuellen T-Zell-Antigenrezeptors erkennen. Dieser ähnelt einem membranassoziierten Immunglobulin-Fab-Fragment. Der T-Zell-Rezeptor (TZR) ist ein Heterodimer aus zwei Ketten ( $\alpha$  und  $\beta$ , bzw.  $\gamma$  und  $\delta$ ), die jeweils konstante und variable Regionen besitzen. Die variablen Regionen bestimmen die Spezifität dieses Rezeptors. Allerdings erkennt der T-Zell-Rezeptor das Antigen nicht selbst, sondern es wird ihm in Bindung an ein Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekül angeboten<sup>16 (S.1072)</sup>. Dazu wird das Antigen von präsentierenden Zellen in kürzere Peptidfragmente gespalten und diese dem Rezeptor anschließend, eingebettet in einer spezifisch gestalteten molekularen Rinne, vorgeführt (sog. T-Zell-Restriktion oder MHC-Restriktion)<sup>17 (S.63)</sup>. Antigenpräsentierende Zellen (APZ) sind Zellen des lympho-hämatopoetischen Systems, die Peptide auf MHC-Klasse-II-Moleküle laden und den T-Zellen so präsentieren, dass diese zur Antwort angeregt werden<sup>17 (S.67)</sup>. Die APZ in Lymphknoten sind Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Spezialisierte dendritische Zellen in der Haut sind die Langerhans-Zellen. An die APZ haften naive T-Zellen jeweils kurz an, um sie auf das MHC-II-gebundene Peptid, das sie spezifisch binden können, abzusuchen. Hat eine T-Zelle ihr Antigen gefunden, so wird sie durch Bindung des Antigens aktiviert. Eine Alternative ist die Erkennung von MHC-I-gebundenen Peptiden auf beliebigen Zellen des Organismus<sup>16 (S.1072)</sup>. Die T-Zell-Erkennung erfasst also zwei Arten von Spezifität: Erstens binden MHC-Präsentationsmoleküle Peptide mit einer gewissen Spezifität, die durch die Form der Grube

und die vorgegebenen Ankerpositionen der Peptide bestimmt ist. Zweitens wird diese MHC-Peptid-Kombination von spezifischen TZR erkannt, wofür eine minimale Bindungsstärke notwendig ist<sup>17 (S.65)</sup>.

Es existieren zwei Untergruppen von T-Lymphozyten, die sich durch die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 unterscheiden. CD steht für „cluster of differentiation“ oder „cluster determinant“. Es handelt sich um Differenzierungsantigene, die durch Gruppen (Cluster) von monoklonalen Antikörpern definiert worden sind<sup>17 (S.62)</sup>.

Diese beiden Oberflächenproteine bestimmen, ob sich der Lymphozyt an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle anlagert, da CD4 nur an Klasse II und CD8 nur an Klasse I bindet. Beide Corezeptoren erhöhen die Empfindlichkeit von T-Lymphozyten für das präsentierende Antigen um den Faktor 100 und stabilisieren den Kontakt zwischen APZ und T-Zelle<sup>16 (S.1072)</sup>.

Für eine optimale Aktivierung ist also nach der Bindung des Liganden die Aggregation des T-Zell-Rezeptors mit dem CD4- bzw. CD8-Antigen erforderlich. Die Übertragung der Aktivierung auf das Zellinnere erfolgt kaskadenartig über den T-Zell-Rezeptor-assoziierten CD3-Komplex, an dessen Ende eine Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren steht, die deren Übertritt in den Zellkern ermöglicht. Die Konsequenz ist eine Änderung der Genexpression der aktivierten Zelle, was wiederum zu Proliferation und Differenzierung führt und mit der gesteigerten Expression von Interleukin 2 (IL-2) einhergeht<sup>16 (S.1073)</sup>. Zu einer Induktion und damit einer Aktivierung der T-Zelle kommt es durch ein Doppelsignal<sup>17 (S.76)</sup>.

Für die optimale Aktivierung der IL-2-Genexpression wird ein costimulatorisches Signal von B-Lymphozyten benötigt. IL-2 reguliert u.a. die Differenzierung der T-Lymphozyten zu Effektorzellen, die über das Integrin VLA-4 in Entzündungsgebieten an das Gefäßendothel binden können. Sie können somit zu Infektionsherden in periphere Gewebe gelangen, wo sie ihre biologische Wirkung zum Einsatz bringen.

Die aktivierten und differenzierten CD4- und CD8-Lymphozyten besitzen unterschiedliche Aufgaben und Funktionen. CD8-Lymphozyten können nur zu zytotoxischen Lymphozyten differenzieren<sup>16 (S.1073f)</sup>. Ihre wichtige biologische Bedeutung liegt darin, dass sie ihre Zielzellen mithilfe ihrer zytotoxischen Proteine lysieren. Sie erkennen meist Peptide endogener Herkunft, die also von der Zelle selbst oder von intrazellulären Parasiten in Zellen synthetisiert wurden, immer in Assoziation mit MHC-Klasse-I<sup>17 (S.81)</sup>.

Reife T-Zellen, die CD4+ exprimieren, werden als T-Helfer-Zellen oder Th-Zellen bezeichnet. Damit wird ihre wichtigste Funktion, die Kooperation mit B-Zellen, hervorgehoben. Die aktivierte T-Helfer-Zelle erkennt auf der B-Zelle die gleiche MHC-Klasse-II-Peptidkombination wie auf der APZ. Über diesen Kontakt und die Interaktion über

CD4, CD40 und CD28 findet eine Signaltransmission auf die B-Zelle statt, die den Wechsel von IgM zu IgG oder anderen Immunoglobulin-Klassen, somatische Mutation und wahrscheinlich auch das Überleben der B-Zelle als sog. Gedächtnis-B-Zelle auslöst<sup>17 (S.78)</sup>.

Als induktiver Stimulus für die B-Zelle dienen lösliche Botenstoffe aus den T-Helfer-Zellen, die Zytokine und Interleukine (IL). Die Einteilung der T-Helfer-Zellen in Th1 oder Th2 wurde auf der Basis ihrer Zytokin-Profile erstellt. Aufgrund der vorwiegenden IL-Muster von T-Helfer-Zellen unterscheidet man zwei Subpopulationen. Die Th1-Antwort ist durch eine frühe Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion charakterisiert, wodurch die zelluläre Immunität unterstützt wird. Th1 Zellen spielen ferner in der chronischen Phase der AD eine Rolle<sup>18</sup>. IL-12 fungiert als wichtigster Förderer der Th1-Zellen und Inhibitor der Th2-Zellen<sup>17 (S.80)</sup>. Th2-Zellen sind für die humorale Immunantwort verantwortlich und sezernieren hauptsächlich die Interleukine 4, 5 und 13. Ferner sind sie wesentlich in der Pathogenese atopischer Erkrankungen beteiligt. Sie unterstützen eine entzündliche Infiltration, die durch eine allergische Reaktion zustande gekommen ist. Außerdem regen sie B-Zellen zur Stimulation von IgE und anderen Antikörpern an<sup>18,19</sup>.

Eine dritte wichtige Art von Lymphozyten exprimiert keine T- oder B-Zellmarker, die sog. Natürlichen Killerzellen (NK). Sie sind in der Lage ohne vorherige Antigenstimulation eine Vielzahl von Tumor- und Virus-infizierten Zellen zu lysieren<sup>1 (S.29)</sup> und sind damit eher Teil der natürlichen Immunität<sup>1 (S.332)</sup>.

### 1.1.2 Costimulation allgemein

Die Costimulation spielt in der T-Zell-vermittelten Immunantwort eine fundamentale Rolle. Die Grundlage dafür lieferte die Erkenntnis, dass für die Aktivierung von T-Zellen zwei unterschiedliche Signale benötigt werden<sup>20</sup>. Damit naive T-Lymphozyten vollständig in den aktivierten Zustand übertreten können, benötigen sie zunächst ein spezifisches Signal, das über die Interaktion des TZR mit dem MHC-II-Molekül an der APZ zustande kommt. Das zweite Signal ist unspezifisch und wird durch die Interaktion costimulatorischer Moleküle freigesetzt<sup>19,21,22</sup>, z.B. von CD28 und CTLA-4 mit den Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) oder *inducible co-stimulatory molecule* (ICOS) mit B7-H2 oder B7-RP-1<sup>19,20,23,24</sup>.

Ein Ausbleiben der costimulatorischen Signale bei der T-Zell-Aktivierung führt in einen Status der Antigen-spezifischen Unerregbarkeit, der Anergie. Diese Entdeckung war für das Verständnis von der Regulation potentiell autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie, der sog. peripheren Toleranz, wesentlich. Eine Costimulation ist für die T-Zell-Aktivierung in den

meisten Fällen erforderlich. Dies kann eine unkontrollierte Aktion verhindern, die von körpereigenen, in nicht-lymphatischen Geweben weit verbreiteten Antigenen ausgeht. Folglich kann Costimulation als ein Hauptmechanismus für die Prävention vor Autoimmunität gesehen werden<sup>20,25</sup>.

## 1.2 CD28 - ein costimulatorisches Molekül

### 1.2.1 Costimulation durch CD28

Costimulatorische Moleküle sind Zelloberflächen-Glykoproteine, die direkt T-Zell-Rezeptor-Signale modulieren und miteinander abstimmen können. Die B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4- und ICOS-B7RP-1-Signalwege setzen sekundäre Schlüsselsignale frei, die die Aktivierung, Hemmung und die Feinabstimmung der Immunantworten von T-Lymphozyten regulieren können<sup>19</sup>.

CD28 ist eines der bestuntersuchten costimulatorischen Moleküle, dessen Einfluss weit in die Mechanismen der T-Zell-Antworten, einschließlich T-Zell-Proliferation, IL-2-Produktion, Verhinderung von Anergie und Induktion des anti-apoptotischen Faktors Bcl-xL, reicht<sup>19,26</sup>. Darüber hinaus kontrolliert CD28 T-Helfer-Zellen sowie B-Zellen und kann außerdem die Entstehung von Keimzentren unterstützen. Schließlich kann CD28 die Differenzierung von B-Zellen und deren Antikörperproduktion beeinflussen. Über eine Regulation der Chemokinrezeptoren und über eine Induktion spezifischer Chemokine ist es CD28 möglich, sich an der T-Zell-Migration in entzündliche Regionen zu beteiligen. Eine Hochregulation inhibitorischer Moleküle wie CTLA-4 schließt sich der T-Zell-Aktivierung an und wird durch CD28 eingeleitet. Durch diesen Mechanismus kann eine normale Immunantwort beendet und damit ein Entstehen einer potentiell gefährlichen Entzündung abgewendet werden. Im Allgemeinen sind naive T-Zellen stärker von der Costimulation durch CD28 abhängig als Gedächtniszellen. Dies lässt sich vermutlich mit einer höheren Schwelle, die zur Aktivierung naiver T-Zellen überwunden werden muss, erklären<sup>27</sup>.

Obwohl es bislang unbestritten ist, dass CD28 potente costimulatorische Signale für die T-Zell-Funktion liefert, mehren sich die Daten aus diversen Experimenten, die die obligatorische Rolle von CD28 in der T-Zell-Aktivierung in Frage stellen. So scheint z.B. die Costimulation durch CD28 für die Aktivierung von CD8+-T-Zellen entbehrlich zu sein, wenn in ausreichender Weise T-Helfer-Funktionen der CD4+-T-Zellen durch CD40 zur Verfügung

gestellt werden<sup>28</sup>. Die CD28-Costimulation ist auch nicht zwingend erforderlich, wenn costimulatorische Signale über alternative Signalwege wie *intracellular molecule 1* (ICAM-1)<sup>29</sup>, IL-2<sup>30</sup> und IL-12<sup>31</sup> geliefert werden, oder eine ausreichende Antigenmenge<sup>32</sup> bzw. ausreichende Dauer und Intensität der Aktivierung von T-Zellen<sup>33</sup> zur Verfügung steht. In Untersuchungen an CD28-defizienten Mäusen<sup>34</sup> und an Abstoßungsreaktionen<sup>35</sup> konnten Unterschiede in der Notwendigkeit, CD28 an der T-Zell-Aktivierung zu beteiligen, festgestellt werden. Überdies zeigte sich, dass in diesem Zusammenhang eine Unterteilung in CD4+- und CD8+-Subpopulationen vorgenommen werden konnte.

Es ist festzuhalten, dass die Interaktion von CD28 mit seinen beiden Liganden B7-1 und B7-2 an der APZ weitestgehend als der wichtigste costimulatorische Signalweg an T-Zellen anzusehen ist<sup>20</sup>.

### 1.2.2 Struktur und Vorkommen von CD28

Alle B7-ähnlichen Moleküle und ihre Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine vom Typ I und außerdem Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie. So wird CD28 als Mitglied dieser Ig-Superfamilie als disulfidverknüpftes Homodimer exprimiert, das aus 44 kDa schweren Polypeptidketten besteht. CD28 wird an 80% der ruhenden T-Zellen, an 90% der T-Helfer-Zellen (CD4+) und an 50% der T-Suppressor-Zellen (CD8+) exprimiert<sup>36,37</sup>. Der Rezeptor CD28 verfügt über 212 Aminosäuren und ist an fünf Stellen glykosyliert<sup>22</sup>. Jede Kette weist eine einzelne extrazelluläre Ig-V-Domäne, eine Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen Teil ohne eigene Kinaseaktivität auf<sup>1</sup> (S.192). Der zytoplasmatische Teil enthält Strukturen, von denen angenommen wird, dass sie bei der Phosphorylierung von CD28 eine Rolle spielen und in der Signaltransduktion involviert sind<sup>38</sup>. Eine bivalente Bindung von CD28 ist für den funktionellen Effekt notwendig, was anhand von *fragment antigen binding* (Fab)- und F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten festgestellt werden konnte<sup>39,40</sup>. Die Interaktion der Rezeptor-Liganden-Paare wird hauptsächlich über Strukturen in ihren Ig-V-ähnlichen Domänen vermittelt. Generell sind Ig-V-Domänen zweischichtige  $\beta$ -Stränge mit Vorder- und Rückseiten<sup>41</sup>. Die extrazelluläre Domäne von CD28 weist eine nur 31%ige Übereinkunft mit den Aminosäuresequenzen von CTLA-4 auf. Trotzdem sind beide Gene auf dem humanen Chromosom 2q33-34 kodiert und verfügen proximal ihrer Ig-V-ähnlichen Domäne im zytoplasmatischen Teil über eine hoch konservierte Stelle, Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr (MYPPPY). Diese Region ist bei dem Vergleich zwischen Mensch, Primat, Maus, Ratte und

sogar Huhn nahezu identisch, was auf eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion und/oder in der Bindung mit ihren Liganden B7-1 und B7-2 hinweist<sup>37</sup>.

### 1.2.3 B7-1 und B7-2 - die Liganden von CD28 und CTLA-4

Es konnten bislang zwei Liganden für CD28 und CTLA-4 gefunden werden: B7-1 (CD80)<sup>42</sup> und B7-2 (CD86)<sup>43</sup>. B7-1 und B7-2 werden von APZ wie aktivierten oder neoplastischen B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert<sup>22</sup>. Die Strukturen der B7-Moleküle scheinen different: so findet sich B7-1 als ein Homodimer, während B7-2 monomer vorkommt. Die Affinität von CD28 zu dessen Liganden B7-1 und B7-2 ist im Vergleich zu CTLA-4 zwischen 20- und 100fach geringer. Auch verfügt es lediglich über eine Bindungsstelle, wogegen CTLA-4 in der Lage ist, zwei Liganden zu binden. CD28 bindet B7-1 mit einer 10fach höheren Affinität als B7-2<sup>44,45</sup>. Untersuchungen haben gezeigt, dass B7-1 effektiver in der Costimulation wirkt, B7-2 scheint jedoch funktionell ein wichtigeres stimulierendes Molekül zu sein. Diese Feststellung führt zu der Annahme, dass die Funktionen der einzelnen Liganden nicht allein mit der Costimulation über den CD28/CTLA-4-Signalweg im Zusammenhang stehen, sondern auch in Verbindung mit komplexeren Interaktionen wirken. Jedenfalls führt die gegenseitige Interaktion der einzelnen Liganden mit CD28 oder CTLA-4 zu einer unterschiedlichen Balance zwischen costimulatorischer oder inhibitorischer Aktivität<sup>44</sup>.

### 1.2.4 Die Funktionen von CD28

#### 1.2.4.1 Allgemeine Funktionen

Costimulation durch CD28 kann die Schwelle zur T-Zell-Aktivierung regulieren und die Anzahl involvierter T-Zell-Rezeptoren für eine effektive T-Zell-Aktivierung signifikant erhöhen<sup>46</sup>. Zu den wichtigsten Funktionen von CD28 zählen die Verstärkung und Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung, die Unterstützung der darauf folgenden Proliferation und Zellzyklusprogression, die Regulation der Zelldifferenzierung sowie die Hinderung der T-Zelle am Eintritt in den anergen Status<sup>36,47,48,49</sup>. Dabei liefert CD28 hauptsächlich quantitative Signale, die zur Überwindung von Signalschwellen eingesetzt werden, wenn dies durch die Verbindung am TZR allein nicht bewältigt werden kann. Um das

bewerkstelligen zu können, besetzt CD28 eine wichtige Rolle als ein Regulator von Gen-Expressions-Programmen, die am Beginn einer Immunantwort aktiviert werden<sup>36</sup>. Dazu veranlasst CD28, nachdem eine APZ ein Signal an den TZR geliefert hat und CD28 in Interaktion mit einem seiner Liganden B7-1 oder B7-2 getreten ist, eine Hochregulation von IL-2-Rezeptoren<sup>50,51</sup> und eine erhöhte Transkription und Stabilisation der IL-2-mRNA<sup>52,53</sup>, womit eine erhöhte Expression von IL-2 erreicht wird<sup>53,54,55</sup>. Zudem löst CD28 eine erhöhte Expression auch weiterer Zytokin-Gene aus, einschließlich IL-4, IL-5<sup>56,57</sup>, IL-6<sup>58</sup>, IL-13<sup>59</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>60</sup>, *Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulation-Factor* (GM-CSF)<sup>61</sup> und *Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ )<sup>62</sup>. Auch Chemokine wie „*Macrophage-Inflammatory-Protein 1 $\alpha$* “ (MIP-1 $\alpha$ ) werden durch CD28 aktiviert<sup>63</sup>. MIP-1 $\alpha$  ist ein Chemokin, das primär mit Zelladhäsion und Zellmigration assoziiert ist. Ihm wird u.a. eine Rolle in der Pathogenese von allergischen Krankheiten wie Asthma, Autoimmunkrankheiten und Tumorerkrankungen zugeschrieben<sup>64,65,66</sup>.

Im Verlauf der Costimulation über CD28 kommt es zu einer Expression weiterer costimulatorischer Rezeptoren wie CTLA-4, CD40-Ligand, ICOS, OX40 und 4-1BB, die unterschiedliche und zum Teil noch unklare Rollen in der T-Zell-Aktivierung besetzen<sup>36,56,67,68</sup>.

CD28 unterstützt die Progression des Zellzyklus über Induktion von Kinasen und Hemmung ihrer Inhibitoren. Während des Übergangs von der G0- in die G1-Phase wachsen die T-Zellen in ihrer Masse, was auf die Expression verschiedener Gene zurückzuführen ist. Diese Gene werden von CD28 induziert und kurbeln ihrerseits die Biosynthese der Makromoleküle und den Metabolismus der Zelle an<sup>36,69,70</sup>.

Als weitere direkte Effekte von CD28 werden das Eingreifen in den Umbau des Chromatins<sup>36,71,72,73</sup> und die DNA-Demethylierung<sup>74</sup> gesehen. Das Auslösen diverser Signalkaskaden ist eine entscheidende Funktion von CD28. Durch sie werden Faktoren wie *Nuclear-Factor of activated T cells* (NFAT), *Nuclear-Factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und AP-1 aktiviert, die Zellproliferation, Zelltod und Zelldifferenzierung kontrollieren<sup>36,70,71,75,76</sup>. MYC, FOS und *Jun-N-terminal kinase* (JUN) werden ebenfalls durch CD28 aktiviert. Sie sind zentrale Faktoren in der Signalmaschinerie zur Integration von Signalen und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren<sup>71,77,78,79</sup>. Das Überleben der T-Zelle wird durch ein anti-apoptisches Programm über eine erhöhte Expression von Überlebensfaktoren wie Bcl-xL unterstützt<sup>47</sup>. Diese Expressionssteigerung wird durch die Bindung von CD28 an seine Liganden direkt ausgelöst. Dabei ist CD28 der wichtigste regulatorische Faktor<sup>80</sup>.

Alle genannten Mechanismen, die direkt von CD28 beeinflusst sind, führen im weiteren Verlauf zu einer Reihe von indirekten Funktionen. Zu nennen sind die Prävention vor Unerregbarkeit gegenüber klonaler Expansion, die Expression weiterer Immunrezeptoren sowie eine Th-Zell-Polarisation zugunsten der Th2-Zellen. CD28 wirkt auch auf die humorale Immunantwort, indem es essentielle Signale für B-Zellen freisetzt. So bewirken Chemokinrezeptoren, dass B-Zellen zu den Follikeln wandern und Immunglobuline herstellen können<sup>81</sup>. Außerdem kann CD28 den Isotypenswitch beeinflussen<sup>82</sup>. Schließlich unterstützt CD28 die Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen und damit auch die zelluläre Immunantwort<sup>83</sup>.

#### 1.2.4.2 Spezielle Funktionen von CD28

Eine zentrale Funktion von CD28 ist die Vermehrung von IL-2. IL-2 ist ein Glykoprotein, mit 130 Aminosäuren. Es induziert die klonale Expansion naiver T-Zellen sowie die Differenzierung der Nachkommen dieser T-Zellen zu Effektorzellen<sup>16 (S.1073)</sup>.

CD28 fungiert als Stabilisator der IL-2-mRNA sowie als Promotor für deren Transkription und erhöht damit die Expression von IL-2. Ein ähnlicher Mechanismus konnte auch für die Faktoren IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden<sup>84</sup>. Gleichzeitig ist CD28 in der Lage, die Rezeptordichte durch unterschiedliche Mechanismen zu erhöhen<sup>85</sup>.

Durch diese Stimulationsmechanismen kommt es in der nächsten Stufe der T-Zell-Antwort, der eigentlichen T-Zell-Replikation, zur Wechselwirkung des von der T-Zelle produzierten und freigesetzten IL-2 mit dem IL-2-Rezeptor auf derselben Zelle, was als autokrine Stimulation bezeichnet wird. Als parakriner Wachstumsfaktor wirkt IL-2 auch auf die umliegenden Zellen. Ziel dieses durch CD28 stimulierten Zytokins ist die Progression des T-Zellzyklus von der G1 in die S-Phase. Die Menge von IL-2, die von aktivierten CD4+-T-Zellen synthetisiert wird, ist bestimmend für das Ausmaß der Immunantwort. Es hilft dabei, andere Zytokine wie Lymphotoxin (LT) und IFN- $\gamma$  zu produzieren, und stimuliert das Wachstum von NK-Zellen und B-Zellen sowie deren Antikörpersynthese. Ein IL-2-Mangel führt zu einer antigenspezifischen T-Zell-Anergie<sup>1 (S.304f)</sup>. Eine hohe Konzentration von IL-2 kann eine Zelle aus dem anergen Zustand führen und damit eine Immunantwort ermöglichen<sup>86</sup>.

### 1.2.4.3 Signalwege von CD28

Die zytoplasmatische Domäne von CD28 verfügt über 41 Aminosäuren und ist Ausgangspunkt verschiedener Signalwege. Von ihr ist jedoch keine intrinsische Aktivität bekannt<sup>86,87</sup>. Die Signalkaskade nimmt ihren Ursprung durch Tyrosinkinase, enthält aber auch Tyrosin-unabhängige Strukturen<sup>88,89,90</sup>. Prinzipiell gehen die Signalwege dann über die PI3-K, die TEC-Kinasen, Vav-1 und Proteinkinase B (Akt). Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist ein Negativregulator dieser Signalwege, die direkt am nicht-phosphorylierten YMNM-Motiv des CD28 binden kann und damit Faktorenaktivierung und IL-2-Produktion verhindert<sup>91</sup>. Durch diese Signalwege werden der Stoffwechsel, das Zytoskelett, die Transkription, die Proteinsynthese und eine optimale Antigenantwort unterstützt, die Zellzyklusprogression und das Überleben der Zelle gefördert<sup>80,92</sup> sowie Apoptose gehemmt<sup>93</sup>. Außerdem wird eine weitere Kaskade costimulatorischer Rezeptoren induziert, die ihrerseits spezifische Funktionen ausüben<sup>36</sup>. Speziellere Funktionen, die über die Signalwege von CD28 ausgelöst werden, sind die Organisation der Plasmamembran, des Zytoskeletts und des Rezeptorenverkehrs, die Umorientierung der *Microtubule Organizing Center* (MTOC)<sup>93</sup> und die Erhöhung des intrazellulären vesikulären Austauschs sowie Chromatinveränderungen<sup>36</sup>. Durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren<sup>94,95,96</sup> und Stoffwechselmetaboliten<sup>97</sup> wird das Überleben der T-Zelle unterstützt. Als weitere Funktionen sind DNA-Modifikationen, eine Verstärkung des T-Zell-Rezeptor-Signals und Expression von Zytokin-Genen beschrieben<sup>36,98,99,100</sup>. Damit kann die Schwelle zur T-Zell-Aktivierung überwunden, klonale Expansion und Th-Zell-Differenzierung gefördert werden. Diese costimulatorischen Vorgänge dienen der Unterstützung der Signale, die vom TZR ausgelöst werden. Dabei gehen alle Signalwege primär vom TZR aus<sup>24,101</sup>.

### 1.2.5 CD28 als Regulator in Toleranz und Autoimmunität

In umfassenden Untersuchungen wurde den Signalen, die von Mitgliedern der B7/CD28-Familie stammen, eine Rolle in der Reifung naiver T-Zellen im Thymus und da besonders in der Entwicklung der Eigentoleranz zugeschrieben. Fast alle costimulatorischen Moleküle und deren Liganden werden im Thymus exprimiert<sup>102</sup>. Die Rolle von CD28 ist bei der Entwicklung der Thymozyten noch unklar. So zeigen Untersuchungen, dass die Costimulation durch CD28 und weitere costimulatorische Moleküle für die normale Selektion im Thymus

nicht obligatorisch zu sein scheint<sup>103,104,105,106</sup>. Allerdings konnte demonstriert werden, dass CD28 für die Reifung normaler Thymozyten benötigt wird<sup>104,107</sup>. Am ehesten ist anzunehmen, dass CD28 die T-Zell-Signale verstärken kann, aber nicht bei der Selektion der Thymozyten notwendig ist. Dies ließe sich durch die Flexibilität des TZR-Repertoires beim Ansprechen auf Selektionssignale erklären<sup>106</sup>.

Aktuelle Arbeiten zeigen, dass CD28/B7-Interaktionen für die Entwicklung und Erhaltung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen notwendig sind<sup>106</sup>. Diese regulatorischen T-Zellen (Tregs) spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Eigentoleranz und T-Zell-Aktivierung, indem sie pathologische Immunantworten kontrollieren, die gegen eigene Moleküle gerichtet sind. Dabei unterstützt CD28 die Expression von CD25 und damit die Erhaltung der Tregs<sup>23</sup>. Tregs entstehen im Thymus durch hochaffine Interaktionen mit eigenen Peptiden<sup>108</sup>. Die Fähigkeit der CD28-Costimulation, die Stärke der TZR-Signale zu erhöhen, scheint bei der Entwicklung der Tregs eine Rolle zu spielen<sup>106</sup>. CD28 ist in der Expansion und dem Überleben von Tregs involviert. Schließlich ist auch die Homöostase der Tregs von der B7/CD28-Interaktion abhängig. Abhängig von seinen Liganden induziert CD28 eine Proliferation von Tregs; B7-2 scheint dabei effektiver als B7-1<sup>109,110,111</sup>. Somit scheint CD28 wesentlich an der Regulation der Eigentoleranz und Autoimmunität beteiligt zu sein.

Diesbezüglich konnte eine abweichende Expression costimulatorischer Rezeptoren in den Zusammenhang von Autoimmunität gebracht werden<sup>86</sup>. Außerdem scheinen Genpolymorphismen der Gene des CD28 und des CTLA-4 Risikofaktoren für autoimmune Erkrankungen und atopische Dermatitis darzustellen<sup>112</sup>.

### 1.2.6 CD28 und Anergie

Die Interaktion zwischen dem TZR und dem MHC-Komplex kann vier verschiedene Reaktionen auslösen: keine Immunantwort, eine produktive T-Zell-Aktivierung, einen durch Aktivierung induzierten Zelltod und den Verlust der Fähigkeit, auf das Antigen zu reagieren. Die Erhaltung der T-Zell-Toleranz ist ein ständiger Prozess, durch den die Immunantwort gewährleistet und Autoimmunität verhindert wird. Die Kontrolle der adulten T-Lymphozyten in der Peripherie ist notwendig, um die immune Toleranz aufrechtzuerhalten. Klonale Anergie meint immunogene Toleranz von B- und T-Lymphozyten, die zu einer Immunantwort im Sinne von Proliferation, Sekretion von Zytokinen und Differenzierung nicht fähig sind<sup>86</sup>. Anergie wird folgendermaßen induziert: ein T-Lymphozyt tritt mit einer APZ über einen

Antigen/MHC-Komplex in Kontakt. Dieser Komplex wird vom TZR erkannt, und es kann zur Proliferation der T-Zelle kommen. Wenn dann aber das costimulatorische Signal durch die CD28/B7-Interaktion nicht freigesetzt wird, tritt die Zelle in den Zustand der Anergie ein, auch wenn sie durch die APZ oder das Antigen restimuliert wird<sup>22,113,114,115</sup>. Anergie kann durch die Blockierung der CD28/B7-Interaktion oder durch CTLA-4 ausgelöst werden<sup>22,116</sup>. Dagegen fördert CD28 eine optimale T-Zell-Aktivierung sowie die Überlebensfähigkeit der T-Zelle und verhindert Anergie<sup>86</sup>.

### 1.3 CTLA-4 - der Gegenspieler von CD28

Die Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen wird für eine effektive Immunantwort gegen Pathogene und für die Erhaltung der Eigentoleranz benötigt. Signale durch die B7/CD28-Familie sind Hauptregulatoren dieser sensiblen Balance. In diesem Zusammenhang wurden die Gegenspieler CD28/CTLA-4 bislang am besten untersucht. Sie setzen sekundäre Signale frei, die die Aktivierung, Hemmung und Feineinstellung der T-Zell-Antworten regulieren können<sup>106</sup>. Es ist ein Paradoxon der Funktion von CD28, dass neben der effizienten T-Zell-Aktivierung über die Stimulation durch den TZR und CD28 auch eine Hochregulierung und Expression von negativen Regulatoren der T-Zell-Funktion initiiert wird<sup>20</sup>.

*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4 oder CD152) wird als ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung und als negatives costimulatorisches Molekül oder Coinhibitor angesehen<sup>117,118,119,120,121</sup>. CTLA-4 ist wie CD28 ein Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie. Es kommt auf der Zelloberfläche an aktivierten T-Zellen und regulatorischen T-Zellen<sup>112</sup> als ein Homodimer vor, dessen einzelne Teile durch eine einfache Disulfidbrücke in der extrazellulären Domäne verbunden sind. Jede monomere Peptidkette verfügt über eine hochaffine Andockstelle für die B7-Moleküle<sup>122</sup>. Der Gensitz von CTLA-4 befindet sich wie der von CD28 auf Chromosom 2, Band q33-q34<sup>123</sup>. CTLA-4 ist ebenfalls ein Oberflächenrezeptor, von dem costimulatorische Signale ausgehen. Obwohl es eine 31%ige Übereinstimmung der Aminosäuren-Struktur mit der von CD28 gibt, besteht kein Hinweis auf ein heterogenes Vorkommen der beiden Moleküle<sup>22</sup>. CTLA-4 hemmt die T-Zell-Antwort über ein Konkurrieren gegen CD28 an den B7-Liganden sowie über Antagonisieren der von CD28 und vom TZR vermittelten Signale<sup>24,124</sup>. CTLA-4 ist der zweite Rezeptor der beiden B7-Liganden B7-1 und B7-2, wobei er wie CD28 eine höhere Affinität zu B7-1 als zu B7-2

aufweist. Insgesamt verfügt er im Vergleich zu CD28 über eine höhere Affinität zu beiden B7-Molekülen<sup>118,125</sup>. CTLA-4 besitzt einige Regionen, die von CD28 verschieden und wahrscheinlich für die erhöhte Affinität verantwortlich sind<sup>126</sup>.

Auch die Expression von CTLA-4 gestaltet sich in Bezug auf die Kinetik von CD28 anders. So wird CTLA-4 ca. 24 - 48 Stunden nach T-Zell-Aktivierung an CD4+-, CD8+- und CD28+- T-Zellen exprimiert<sup>117</sup>. Es kommt an B-Zellen vor, die durch T-Helfer-Zellen aktiviert wurden<sup>127,128</sup>, und lässt sich auch an unreifen T-Zellen finden<sup>129</sup>. CTLA-4 wird während der Aktivierung von einem Speicher in perinukleären Golgi-Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und dann rasch über Endozytose auf die Zelloberfläche befördert<sup>21</sup>. Die Aktivierung von CTLA-4 ist weitgehend von den costimulatorischen Signalen durch CD28 abhängig<sup>117,129</sup>. Es werden CTLA-4 auch Funktionen als Negativregulator zugeschrieben, die von CD28 unabhängig sind<sup>124</sup>.

CTLA-4 verhindert die Synthese von IL-2 sowie eine Zellzyklusprogression und beendet T-Zell-Antworten<sup>68,130</sup>. So lässt es T-Zellen länger in der G1-Phase, aus der es der T-Zelle leichter möglich ist, wieder in die G0-Phase zurückzutreten. Es verlängert auch die Zeit, in der die Zelle von der G1- in die S-Phase übertritt<sup>86,130</sup>. CTLA-4 kann die T-Zell-Expansion über eine Abschwächung der aktivierenden Signale negativ beeinflussen, so z.B. die Aktivität von AP-1, NFAT und NF- $\chi$ B<sup>121</sup>.

CTLA-4 ist ein wichtiges Molekül in der Induktion von Anergie und bei der Erhaltung von Eigentoleranz. Diesbezüglich gestalten sich die Untersuchungsergebnisse bislang nicht einheitlich. So konnte durch verschiedene Blockaden von CTLA-4 die T-Zell-Toleranz aufgehoben werden. In Arbeiten mit *in-vivo*-Blockaden der CTLA-4/B7-Interaktion ließ sich dagegen ein Verlust der Eigentoleranz nicht induzieren<sup>125,131,132</sup>. CTLA-4 scheint auch eine zentrale Rolle bei Tumorerkrankungen, Transplantatabstoßungsreaktionen, Allergie und Asthma sowie bei autoimmunen Erkrankungen zu spielen<sup>15,23,133,134</sup>. So führt beispielsweise eine Blockade von CTLA-4 zu einer gesteigerten Immunantwort *in vivo* und einer verstärkten Immunität gegen Tumore<sup>135,136</sup>. CTLA-4 kann auch die Initiierung einer Immunantwort und die nachfolgende T-Zell-Aktivierung regulieren. In ruhenden T-Zellen vermag es die Schwelle zur T-Zell-Aktivierung zu erhöhen. Dabei schützt CTLA-4 vor einer unerwünschten Aktivierung durch schwache TZR-Signale, die scheinbar für das Überleben von naiven und Gedächtnis-T-Zellen notwendig sind, und verhindert dadurch autoimmune Krankheiten<sup>124</sup>. Wichtig im Zusammenhang mit Toleranz ist zu erwähnen, dass Tregs CTLA-4 auf ihrer Oberfläche konstitutionell exprimieren. Ferner scheint eine CTLA-4-Expression CD28-

Signale auf Tregs abzuschwächen. Der weitere Einfluss von CTLA-4 auf ihre Selektion im Thymus, ihre Proliferation und ihr Überleben bleibt unklar<sup>111</sup>.

CTLA-4 ist auch bei der Regulation der T-Helfer-Zelldifferenzierung beteiligt. Dabei haben CD28 und CTLA-4 gegenteilige Effekte: während CD28 die Differenzierung der Th2- Zellen fördert, hemmt CTLA-4 die Ausbreitung der Th-2-Zytokine und wirkt damit dem Krankheitsgeschehen atopischer Erkrankungen entgegen<sup>137, 138</sup>.

Festzuhalten bleibt, dass die Immunantwort einer Zelle als eine Balance zwischen CD28 und CTLA-4 gesehen werden kann<sup>117</sup>.

## 1.4 Atopische Erkrankungen

### 1.4.1 Atopie allgemein

Menschen mit atopischer Erkrankung leiden in charakteristischer Weise an einem oder mehreren Symptomen einer Allergie. Die häufigsten Formen dieser atopischen Krankheiten sind allergische Rhinitis, Atopische Dermatitis (AD) und bronchiales Asthma. Die klinisch-pathologischen Merkmale sind von der anatomischen Lokalisation abhängig. Dabei spielen eine Reihe von Faktoren eine Rolle: der Ort des Antigenkontakts, die Art des Allergens, die Zahl der Mastzellen in verschiedenen Zielorganen, der Phänotyp der lokalen Mastzelle und die Ansprechbarkeit der Zielorgane auf Mastzellen. Außerdem können nur gewisse Arten von Antigenen Überempfindlichkeitsreaktionen auslösen. Ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung dieser allergischen Erkrankungen ist die Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp<sup>1 (S.349)</sup>. Er ist gekennzeichnet durch raschen Plasmaaustritt aus dem Gefäßsystem, Vasodilatation, Bronchokonstriktion und lokale Entzündung. Um dies zu erreichen, löst ein Allergen eine Antigenbindung an Immunoglobulin E (IgE) aus, das sich an Mastzellen, basophilen Granulozyten und Langerhanszellen befindet<sup>139</sup>. IgE ist der Immunoglobulin-Isotyp, der eine  $\epsilon$ -H-Kette aufweist, und ist ein Produkt eines Isotypenswitchs der schweren Ketten<sup>1 (S.340)</sup>. Die Induktion der IgE-Synthese, die bei der Soforttyp-Reaktion nach Coombs und Gell eine wichtige Rolle spielt, geschieht durch B-Zellen, die mindestens zwei Stimuli benötigen. Der erste Stimulus ist die Aktivierung der B-Zelle durch Zytokine, wie IL-4 und IL-13, der zweite ist die Bindung des IgE an CD40 auf B-Zellen<sup>140,141,142,143</sup>. Eine Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren kann Mastzellen und Basophile aktivieren und damit eine Freisetzung ihrer Mediatoren bewirken. Durch Histamin und andere

Entzündungsmediatoren werden die rasch eintretenden Ereignisse der Soforttyp-Überempfindlichkeit, wie Flüssigkeitsaustritt, Vasodilatation und Bronchokonstriktion, eingeleitet. Die entzündlichen Infiltrate der Spätphasereaktion enthalten hohe Anteile an eosinophilen Granulozyten und Th2-Lymphozyten. Zytokine vermitteln die Spätphasereaktion<sup>1 (S.352),144,145,146</sup>.

Atopische Patienten, besonders mit schwerer Atopie, zeichnen sich durch erhöhte IgE-Spiegel im Blut aus. Sie weisen auch eine größere Anzahl hochaffiner Fc<sub>E</sub>-Rezeptoren pro Mastzelle auf. Von diesen Rezeptoren ist ein höherer Anteil durch IgE besetzt als bei nicht-atopischen Menschen<sup>1 (S.349)</sup>. Die IgE-Synthese wird durch genetische Einflüsse, Antigen-Exposition und Zytokine von T-Zellen reguliert. Gerade Th2-Zellen begünstigen durch ihre Sekretion von IL-4 und IL-5 die IgE-Produktion und erhöhen den Anteil an eosinophilen Granulozyten der entzündlichen Infiltrate<sup>1 (S.352)</sup>.

## 1.4.2 Atopische Dermatitis

### 1.4.2.1 Diagnosekriterien

Die AD ist eine atopische Systemerkrankung, die im Wesentlichen die Haut betrifft<sup>147</sup>. In der Diagnosestellung richtet man sich heute nach den diagnostischen Kriterien von Hanifin und Raika<sup>148</sup>. Hierbei stellen der Pruritus, Lichenifikationen, die Chronifizierung und eine positive familiäre Anamnese die Hauptkriterien der AD. Als Nebenkriterien gelten unter anderem Xerose, Ichthyose, gehäufte Infektionen der Haut, erhöhte Serum-IgE-Spiegel, positive Typ-I-Reaktionen, die Dennie-Morgan Hautfalte, eine laterale Augenbrauenlichtung (Herthog-Zeichen) sowie ein weißer Dermographismus. Zur Diagnosestellung müssen mindestens drei Haupt- und drei Nebenkriterien zu finden sein<sup>149</sup>. Klinisch ist das Erscheinungsbild äußerst variabel. Die Hauterscheinungen können von akuten papulo-vesikulösen bis zu chronisch lichenifizierten, hyperkeratotischen Formen führen. Das Exanthem ist typischerweise symmetrisch und beugenbetont angeordnet. Der Verlauf und die Prognose der Erkrankung sind individuell sehr verschieden und nicht absehbar<sup>150</sup>.

### 1.4.2.2 Formen der Atopischen Dermatitis

Bislang wurden zwei Formen der AD unterschieden: eine IgE-assoziierte Form, die extrinsische Atopische Dermatitis, und eine nicht-IgE-assoziierte Form, die intrinsische

Atopische Dermatitis. Nach neueren Gesichtspunkten wird entgegen dieser Einteilung, die zwei unterschiedliche Erkrankungen terminiert, eine dreiphasische Entwicklung der AD vermutet. Die initiale Phase ist dabei durch eine nicht-atopische Form der Dermatitis in früher Kindheit gekennzeichnet, diese findet vor einer Sensibilisierung statt. In der zweiten Phase kommt es dann bei 60-80% der Patienten zu einem Einfluss genetischer Faktoren, die eine IgE-vermittelte Sensibilisierung von Nahrungs- oder Umweltallergenen oder beidem initiieren. Dies ist die Entwicklung in eine extrinsische Form. Drittens werden in mechanisch bedingten Wunden Autoantigene, die Autoantikörper gegen IgE induzieren, freigesetzt<sup>151</sup>.

#### 1.4.2.3 Histologie

Eine Biopsie der ekzematös veränderten Hautstellen weist ein mononukleäres, hauptsächlich aus Lymphozyten und Histiocyten bestehendes Infiltrat auf. Das histologische Bild variiert jedoch nach Art des erkrankten Hautareals und ist von der Krankheitsdauer abhängig. Es finden sich Spongiose und spongiotische Bläschen. Akute Läsionen sind zudem durch ein interzelluläres Ödem in der Epidermis und paravesikuläre Infiltrate aus Histiocyten und Lymphozyten gekennzeichnet. Das lymphozytäre Infiltrat besteht hauptsächlich aus Gedächtnis-T-Zellen, an denen die Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD45 R0 zu finden sind. Weiterhin sind eine beginnende Akanthose mit Hyperkeratose und Parakeratose nachweisbar. In chronisch lichenifizierten Arealen stellt sich die Epidermis hyperplastisch mit einer Elongation der *rete ridges* und ausgeprägter Hyperkeratose dar. Einen großen Teil des mononukleären Zellinfiltrats machen Langerhanszellen und Makrophagen aus. Die Anzahl der Mastzellen ist ebenfalls erhöht, sie erscheinen jedoch hauptsächlich granuliert. In chronischen Hautläsionen lassen sich auch vermehrt Eosinophile nachweisen, die in akuten Läsionen nicht vorkommen<sup>18,152</sup>. Dieses histologische Erscheinungsbild erinnert an eine allergische Kontaktdermatitis<sup>150</sup>.

#### 1.4.2.4 Pathophysiologie

Die komplexe Pathogenese der AD ist multifaktorieller Art. Störungen des unspezifischen und des spezifischen Immunsystems beeinflussen das Erscheinungsbild und den Verlauf dieser entzündlichen Hauterkrankung ebenso wie eine weit reichende Interaktion zwischen Immunsystem, Umwelteinflüssen (Aeroallergene und Mikroben), genetischen Faktoren und einer gestörten Hautbarriere<sup>18</sup>. Bei der AD lässt sich eine verminderte Anzahl der T-Zellen im

peripheren Blut feststellen. Dabei herrscht ein numerisches und funktionelles Defizit der CD8+-T-Zellen vom Suppressor-Typ, so dass das Verhältnis der CD8+-T-Zellen und der CD4+-T-Zellen zugunsten der CD4+-T-Zellen verschoben ist<sup>150,153</sup>. Allergenspezifische CD4+- und CD8+-T-Zellen können aus Hautläsionen von Patienten, die an atopischer Dermatitis erkrankt sind, isoliert werden<sup>18</sup>. Die Rekrutierung von T-Zellen, dendritischen Zellen und eosinophilen Zellen wird über ein komplexes Netzwerk proinflammatorischer Zytokine und Chemokine vermittelt, das von einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen gebildet wird, einschließlich der Keratinozyten, vaskulärer Endothelzellen, T-Lymphozyten und eosinophiler Granulozyten. Ferner sind in atopischer Haut antimikrobielle Peptide in ihrer Menge reduziert, was zu einer Kolonisation diverser Mikroorganismen auf der entzündlich veränderten Haut führt. Diese Mikroorganismen produzieren proinflammatorische Zytokine, die eine entzündliche Antwort in der Haut wiederum verstärken<sup>147</sup>.

In den frühen Stadien der AD ereignet sich eine relevante Hochregulierung diverser proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF und IL-18, die klinisch durch Pruritus und eine Kolonisation durch Mikroorganismen begleitet wird<sup>147</sup>. Das hauptsächlich durch Th2-Zellen gebildete IL-31 ist bei der Entstehung des Pruritus und der Dermatitis involviert<sup>154</sup>.

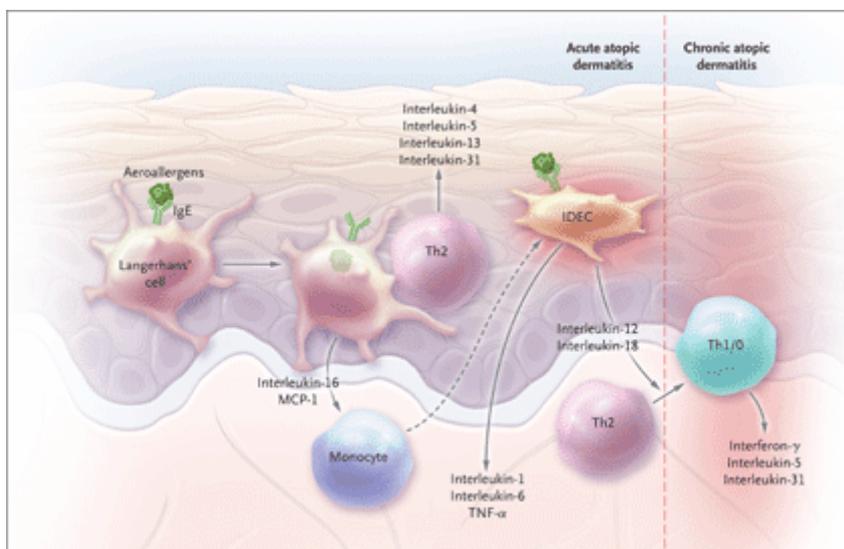


Abbildung 1: akute und chronische Phase von IgE- und T-Zell-vermittelter Atopischer Dermatitis

In der akuten Phase der AD werden Langerhanszellen durch die Bindung auf Allergenen aktiviert, vermittelt von spezifischem IgE und FcRI. Sie produzieren Monozyten chemotaktisches Protein 1 (MCP-1) und IL-16. Die Peptide aus Allergenen werden den T-Zellen durch Langerhans-Zellen präsentiert. Dadurch wird ein Th2-Profil induziert. Nach Migration in die Haut differenzieren die rekrutierten Monozyten in IDEC und beginnen mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF. Ihre Sekretion der Zytokine IL-12 und IL-18 führt zu dem Wechsel von Th2 zu Th1/0, was wiederum zur chronischen Phase der Erkrankung führt. (Abbildung nach: Bieber T, 2008<sup>151</sup>)

Zwei unterschiedliche Typen von dendritischen Zellpopulationen werden bei der AD beschrieben: die Langerhans-Zellen und die *infiltrating inflammatory dendritic epidermal cells* (IDEC)<sup>155,156</sup>. Beide Zelltypen sezernieren proinflammatorische Zytokine. Langerhanszellen spielen in der initialen AD eine wesentliche Rolle und unterstützen eine Th2-Polarisation. IDEC führen über eine IL-32- und IL-18-Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu einer Th1-Polarisation<sup>151</sup>. IDEC scheinen zudem vermehrt B7-1 und B7-2 zu exprimieren und eine Rolle in der Antigenpräsentation in atopischer Haut zu spielen<sup>157</sup>.

AD ist eine biphasisch T-Zell-vermittelte Erkrankung. Eine initiale Th2-Phase geht einer chronischen Phase voraus, in der Th0-Zellen und Th1-Zellen dominant wirken<sup>158</sup>. Der Wechsel in die Th1-Polarisation wird durch Zytokine wie IL-18 und IL-12 sowie durch Genpolymorphismen von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems beeinflusst<sup>18,151</sup>.

Die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 dominieren in der akuten Phase der Läsionen. Sie regulieren, u.a. durch einen IgE-Isotypenswitch, die IgE-Produktion herauf<sup>159</sup>. Weiterhin erlauben Th2-Zytokine in Verbindung mit einer defekten Hautbarriere und Entzündungsreaktion ein vermehrtes Eindringen von Umweltallergenen in die Haut, wodurch eine systemische Th2-Antwort induziert und ebenfalls die IgE-Produktion erhöht wird<sup>18</sup>. Somit hat eine Mehrheit der AD-Patienten erhöhte IgE-Werte, die wiederum mit der Krankheitsaktivität korrelieren<sup>160</sup>. Über Antigen-spezifische IgE-Komplexe werden Mastzellen aktiviert, die eine entzündliche Antwort induzieren<sup>147</sup>. In ca. 25% aller an AD erkrankten Erwachsenen lassen sich IgE-Antikörper, die gegen Autoantigene gerichtet sind, nachweisen<sup>161</sup>. IgE-Antikörper bei AD können durch Umweltallergene induziert werden, aber IgE-Antikörper, die gegen Autoantigene in der Haut gerichtet sind, können die allergische Entzündung fortbestehen lassen. Also scheint die AD eine Erkrankung an der Schwelle zwischen Allergie und Autoimmunität zu sein<sup>151</sup>.

Während der Chronifizierung der Läsionen steigen die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-5 und GM-CSF an, was für eine Dominanz von Th0- und Th1-Zellen typisch ist<sup>159</sup>. IL-12 und IFN- $\gamma$  wirken sich eher hemmend auf die IgE-Synthese aus. Abhängig vom Zytokin-Milieu sind Th0-Zellen in der Lage, in Th1- oder Th2-Zellen zu differenzieren<sup>151</sup>. Es lassen sich eosinophile Infiltrate, frei zirkulierende Eosinophile und eosinophile Granulome in Patienten mit AD finden, die hauptsächlich durch IL-5 beeinflusst werden. Die Werte von IL-5 und eosinophiler Chemotaxine sind insbesondere während der Krankheitsschübe erhöht<sup>18</sup>. Die Anzahl zirkulierender NK-Zellen ist bei der AD reduziert<sup>162,163</sup>, wobei NK-Zellen in

Hautläsionen in engem Kontakt zu den DC stehen und eine Rolle in der Reifung der DCs spielen sowie deren costimulatorische Kapazitäten verbessern<sup>18</sup>.

Schließlich weisen Patienten mit AD eine erhöhte Anzahl an Treg-Zellen mit normaler Aktivität im peripheren Blut auf, die Rolle dieser Zellen bleibt jedoch weiterhin unklar<sup>151</sup>. Ein weiteres Mitglied der CD4+-T-Zell-Familie, die Th17-Unterform der T-Helferzellen, scheint mit deren Zytokinen bei der Entstehung autoimmuner Erkrankungen von Bedeutung zu sein<sup>18</sup>. Nachweise von einer erhöhten Expression von IL-17 und IL-11 in akuten Läsionen in AD lassen den Schluss zu, dass IL-17 und IL-11 in der Pathogenese der AD involviert sind<sup>164</sup>.

Störungen des angeborenen Immunsystems wie eine gestörte Hautbarriere sind Zeichen atopischer Haut und führen zu einer Besiedlung mikrobieller Organismen<sup>165</sup>. Epitheliale Zellen bilden den ersten Schutzwall gegenüber der Umwelt. Sie sind mit einer Vielfalt an sensiblen Strukturen ausgestattet, wie den *toll-like* Rezeptoren (TLR), den *C-type* Lektinen, den *Nucleotide-binding oligomerization domain-like* Rezeptoren (NOD) und den *Peptidoglycan-recognition* Proteinen<sup>166,167</sup>. Dabei unterstützt eine Mehrheit der TLR-Liganden die Entwicklung von Th1- und Th17-Zellen, die wiederum für die antibakterielle und antivirale Immunität wichtig sind<sup>168</sup>. Antimikrobielle Peptide stellen eine essentielle Komponente der Hautbarriere dar<sup>169</sup>. Das entzündliche Mikromilieu in der Haut von Patienten mit AD, welches durch IL-4, IL-13 und IL-10 erhalten wird, reguliert die antimikrobiellen Peptide herab<sup>151</sup>. Zudem verstärken schwache TLR2- und TLR4-Signale im Kontext allergischer Exposition eine Th2-Immunantwort<sup>170,171</sup>, die ebenfalls die Anzahl antimikrobieller Peptide vermindert und eine bakterielle Besiedlung und Entzündungsreaktion unterstützt<sup>147</sup>. Ferner beeinflussen die Th2-Zellen Peptide, die für die mikrobielle Abwehr zuständig sind<sup>172</sup>.

Ca. 90% der AD-Patienten sind mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) besiedelt<sup>173</sup>. *S. aureus* scheint in der Pathogenese der AD involviert zu sein. Sein Superantigen wird vermehrt bei Krankheitsaktivität gebildet. Die gebildeten Mengen des Superantigens scheinen mit der Schwere der Erkrankung zu korrelieren<sup>172</sup>. *S. aureus* wirkt sich negativ auf Tregs aus und beeinflusst über sein Enterotoxin die T-Zellproliferation und T-Zell-Rekrutierung<sup>151</sup>. So fördert *S. aureus* ein Th2-Milieu und gefährdet die Hautbarrierefunktion<sup>172,174,175</sup>. Zudem produziert *S. aureus* wie auch andere Mikroorganismen proinflammatorische Zytokine, die eine Entzündungsreaktion in der Haut verstärken. Zusätzlich sind eine Reihe von Chemokinen, die durch unterschiedliche Zellen gebildet werden, wie Keratinozyten,

vaskuläre Endothelzellen und Langerhanszellen, für eine Rekrutierung verschiedener Leukozyten in die entzündliche Haut verantwortlich<sup>147</sup>.

Neben den zahlreichen erworbenen Defekten des Immunsystems spielen in der Pathogenese auch genetische Defekte eine zentrale Rolle. AD ist eine Erkrankung mit komplexen genetischen Defekten, die durch Gen-Gen und Gen-Umwelt-Interaktionen entstehen. Zwei Gruppen von Genen sind hierbei betroffen: Gene, die epidermale oder epitheliale Strukturproteine kodieren, und Gene, die zentrale Elemente des Immunsystems kodieren. Genetische Untersuchungen weisen auf eine Reihe von AD-korrespondierenden Genloci auf unterschiedlichen Chromosomen hin. Alle diese kodieren Zytokine, die an der Regulierung der IgE-Synthese beteiligt sind, wie IL-4, IL-5, IL-12, IL-13 und GM-CSF. In Patienten mit AD affiziert eine genetisch determinierte Th2-Dominanz die Reifung der B-Zellen und eine genetisch bedingte Veränderung in diesen Zellen, was zu einem vermehrten Isotypenswitch von IgM zu IgE führt<sup>151</sup>.

Es konnten zahlreiche Mutationen des fillagrin-Gens (FLG) in Verbindung mit AD nachgewiesen werden<sup>176</sup>. Diese Mutationen entstehen hauptsächlich im Frühstadium der AD und weisen auf eine zusätzliche Neigung zu allergischem Asthma hin<sup>151</sup>. Genetische Defekte des FLG führen zu einer Barrierestörung der Haut<sup>172</sup> und erhöhen das Risiko, an AD zu erkranken<sup>177</sup>. Demgegenüber kann auch eine zu Grunde liegende Entzündung die Expression einiger Gene stören, die wie das FLG in die epitheliale Schrankenfunktion involviert sind, was es Umweltallergenen erlaubt, in die Haut einzudringen, und, in Verbindung mit Pruritus, eine Entzündung und Sensibilisierung begünstigt<sup>151</sup>. Die Hautbarriere wird auch über Th2-Zytokine beeinflusst, indem sie die Expression von Fillagrin und anderen Strukturproteinen modulieren<sup>172</sup>. Ferner scheinen Defekte im Stratum corneum und in den Neutrophilen vorzuliegen. Die Unversehrtheit des Stratum corneums ist für die Erhaltung der protektiven Funktion essentiell. Fillagrin spielt dabei in der Differenzierung von Keratinozyten eine tragende Rolle<sup>147,177</sup>. Reduzierte Mengen der Lipide Sphingosin und Ceramid im Stratum corneum tragen ebenfalls zu einer Störung der Hautbarrierefunktion bei<sup>178,179</sup>.

### 1.4.3 Allergisches bronchiales Asthma

Ähnlich verhält es sich beim allergischen bronchialen Asthma, das in entwickelten Ländern bereits epidemische Ausmaße angenommen hat<sup>180</sup>. Patienten mit Asthma leiden direkt nach der Inhalation des Antigens unter einer akuten Bronchokonstriktion und einer Verdickung des

bronchialen Sekrets. Chronische Symptome schließen eine Überempfindlichkeit der Luftwege gegenüber bronchospasmogenen Stimuli, eine chronische Entzündung und den Umbau der Luftwege ein. Im Zentrum des Prozesses der chronischen Entzündung und des Umbaus der Luftwege steht der T-Lymphozyt<sup>19,181</sup>. Deshalb sind die T-Zell-Rekrutierung und -Differenzierung wichtige Elemente in der Entstehung des asthmatischen Status. Die regulierenden Faktoren sind noch nicht gänzlich zu erklären. Dabei sind aber ebenfalls die Produktionen der Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 als die hauptursächlichen Veränderungen im asthmatischen Phänotyp hervorzuheben<sup>182</sup>. Dies wird unter anderem durch das Zytokinprofil der T-Zelle beeinflusst. Wie bereits beschrieben, hängt dieses stark von den Signalen der APZ und deren Costimulation durch CD28 und CTLA-4 ab<sup>183</sup>.

## 1.5 Aufgabenstellung

CD28 ist ein Molekül, das bekanntermaßen in mehrfacher Hinsicht eine zentrale Rolle in der T-Zell-Immunität spielt. Dabei hervorzuheben ist, dass die Costimulation über CD28 zwischen T-Zell-Aktivierung und Toleranz entscheidet, B- und T-Helfer-Zellen kontrolliert und damit auch Teile der Pathogenese von atopischen, autoimmunen oder malignen Erkrankungen beeinflusst.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zu etablieren, die zum Nachweis von CD28-Autoantikörpern geeignet ist. Dazu sollen Seren von Patienten mit unterschiedlichen entzündlichen und nicht-entzündlichen Hautkrankheiten sowie von gesunden Individuen als Kontrollgruppe auf die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen CD28 getestet werden. Die Methode umfasst die Spaltung eines CD28-Fusionsproteins mit Trypsin, die elektrophoretische Auftrennung der Spaltprodukte und die Detektion der Antikörper durch Western-Blotting.

Da schon mehrfach Zusammenhänge zwischen Autoantikörpern gegen Oberflächenmoleküle und bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden konnten, soll im Weiteren der Frage nachgegangen werden, ob diese Autoantikörper mit Faktoren wie Alter und Geschlecht oder speziellen Erkrankungen assoziiert sind. Dies wird mithilfe statistischer Analysen verifiziert. In einem letzten Schritt soll in einer gemischten lymphozytären Reaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) die immunologische Relevanz dieser Autoantikörper in einem Anergie-Modell untersucht werden.

## 2. Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Nachweisen des Vorkommens von Autoantikörpern gegen CD28 durch Western-Blotting im Serum von Probanden

### 2.1.1 Proteinspaltung mit Trypsin

#### Versuchsvorbereitung:

Mit PBS wurde Trypsin auf eine Konzentration von 10mg/ml und die Chimäre auf eine Konzentration von 1mg/ml verdünnt. Für einen Ansatz mit 100µg Chimäre wurden 50µl Trypsin eingesetzt.

#### Berechnung der Trypsinaktivität und der erforderlichen Trypsinhemmerkonzentrationen:

Der Hersteller gibt die Trypsinaktivität bei 10mg/ml mit 150 U/ml an.

Bei 50µl eingesetztem Trypsin entspricht das einer Aktivität von 7,5 Units pro Ansatz.

Für Aprotinin gilt, dass 10mg Aprotinin 2000 IU Trypsin hemmen. Bei einer Konzentration von 10mg/ml hemmen 3,75µl Aprotinin 7,5 IU Trypsin.

TLCK (N-Tosyl-L-Lysinchloromethyl Keton) liegt in einer Konzentration von 20mg/ml vor. Die empfohlene Arbeitskonzentration ist 50µg/ml. Damit sind 2,5µl für die Trypsinhemmung bei 50µl eingesetztem Trypsin notwendig.

#### Versuchsdurchführung:

100µg Chimäre wurden 50µl Trypsin zugefügt und das Gemisch bei 37°C inkubiert. 10µl Aprotinin mit 2,5µl TLCK wurden nach 15 Minuten für die Reaktionshemmung zugesetzt. Anschließend wurde 150µl nicht reduzierender Probenpuffer zugegeben.

### 2.1.2 SDS-Page

*(Sodium-dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)*

#### Rezepturen:

Acrylamidlösung:           aus 30g Acrylamid

0,8g N,N-Methylbisacrylamid  
ad 100ml H<sub>2</sub>O, filtrieren, dunkel aufbewahren,  
fertig als Lösung 10%ig kaufen (s. Materialliste)

Trenngelpuffer (4fach): 18,15g Tris  
0,4g SDS  
in 50ml H<sub>2</sub>O lösen, mit 0,1 molarer HCl pH 8,8 einstellen,  
ad 100ml H<sub>2</sub>O

Sammelgelpuffer (4fach): 6,05g Tris  
0,4g SDS  
in 50ml H<sub>2</sub>O lösen, pH6,8 einstellen, ad 100ml H<sub>2</sub>O

Tankpuffer (5fach): 15,0g Tris  
72,0g Glycin  
5,0g SDS  
ad 1 Liter H<sub>2</sub>O, pH-Wert liegt bei ca. 8,3. Puffer vor dem Benutzen  
verdünnen.

Bromphenolblau: 20mg Bromphenolblau ad 10ml H<sub>2</sub>O  
(0,2% Stocklösung)

Probenpuffer (2fach): 0,379g Tris  
1,0g SDS  
in 10ml H<sub>2</sub>O lösen, pH 6,8 einstellen, Zugabe von 5,0 ml Glycerin  
400µl Bromphenolblau-Stocklösung  
ad 25ml H<sub>2</sub>O.

Ammoniumpersulfat: 0,1g Ammoniumpersulfat ad 1ml H<sub>2</sub>O.  
("Per", 10%) Die Lösung bei 4°C dunkel lagern.

Trenngel 10%: Diese Menge reicht für 4 Gele à 0,75 mm Dicke.

Polymerisierzeit: 1h 8,3ml Acrylamidlösung  
6,25ml Trenngelpuffer 4fach

10ml H<sub>2</sub>O  
75µl Per  
20µl TEMED

Sammelgel 4%: Diese Menge reicht für 4 Gele à 0,75 mm Dicke.  
Polymerisierzeit: 1h 1,3ml Acrylamidlösung  
2,5ml Sammelgelpuffer 4fach  
6,162ml H<sub>2</sub>O  
40µl Per  
8µl TEMED

#### Versuchsdurchführung:

Zum Gießen des 10%igen Trenngels wurden alle oben angegebenen Reagenzien zusammengegeben. Das Gel wurde zum Auspolimerisieren 60 Minuten bei Licht und Raumtemperatur stehen gelassen.

Die 4%igen Sammelgele wurden mit Kamm auf das Trenngel gegossen. Das Auspolymerisieren der Gele erfolgte erneut entweder bei Licht über 60 Minuten oder über Nacht im Kühlschrank.

Dann wurde das Gel vorsichtig aus der Kammer gelöst. Nach dem Einsetzen der Gele in die Elektrophoresekammer wurden die Kammer und die Schale mit Tankpuffer (1:4 verdünnt) gefüllt.

Zum Austitrieren, d.h. zur Feststellung der geeigneten Menge des Chimäremisches pro Blotspur, wurde in zwei Taschen 5µl, in die nächsten zwei Taschen 2µl und in zwei weitere Taschen 1µl Chimäremisch mit der jeweiligen Menge an nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer gegeben.

Bei der Untersuchung der Patientenserien wurde für den Blot ein Kamm mit einer kleinen und einer großen Kammer verwendet, wobei die große Tasche dem Volumen von 10 kleinen Taschen entspricht. In die kleine Tasche wurde ein Standard gegeben. Die Füllung der großen Geltasche hing dann vom Ergebnis der Austitration ab. Meist erwiesen sich 40µl oder 20µl als günstig. Das Chimäremisch wurde mit 100µl nicht-reduzierendem Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 110V unter Wasserkühlung in zwei Stunden.

### 2.1.3 Blotting

#### Rezepturen:

Transferpuffer:

1. Anodenpuffer I:           36,3g Tris (300mM)  
                                  200ml Methanol (20%v/v)  
                                  ad 1 Liter aqua dem.
  
2. Anodenpuffer II:         3,03g Tris (25mM)  
                                  200ml Methanol (20%v/v)  
                                  ad 1 Liter aqua dem.
  
3. Kathodenpuffer:         5,2g 6-Aminohexansäure (40mM)  
                                  0,1g SDS (0,1%g/v)  
                                  200ml Methanol (20%v/v)  
                                  ad 1 Liter aqua dem.

#### Versuchsdurchführung:

Nach der Trennung musste das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Sammelgel entfernt werden. Das Trenngel wurde in Anodenpuffer II äquilibriert.

Die Polyvenyldiflouridmembran (PVDF)-Membran wurde zugeschnitten, anschließend ca. 30 Sek. in Methanol aktiviert und dann mit Anodenpuffer II gespült.

Von 18 Filterpapieren, mit Handschuhen zurechtgeschnitten, wurden

- 6 Stück in Anodenpuffer I
- 3 Stück in Anodenpuffer II
- 9 Stück in Kathodenpuffer

getränkt und nach Herstellerangabe mit den Filterpapieren, dem Gel und der PVDF- Membran geschichtet.

Schließlich wurde die befeuchtete Kathode aufgesetzt und an den *Electrophoresis Power Supply* (EPS 600 Pharmacia Biotech) angeschlossen. Der Lauf erfolgte zwei Stunden lang bei 50mA.

## 2.1.4 Immunoprinting

### Rezepturen:

PBS: NaCl 8g  
KCl 0,2g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,12g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydr. 0,91g  
ad 1 Liter aqua dest.

PBS Tween: 1ml Tween20  
ad 1000ml PBS

Tris Puffer: 8,06g NaCl  
0,2g KCl  
6,06g Tris  
ad 1 Liter aqua dem.  
pH 8,0

Magermilchlösung: 1g Magermilchpulver  
20ml H<sub>2</sub>O

Tris-AP-Puffer: 60,55g Tris  
29,22g NaCl  
5,08g Mg Cl<sub>2</sub>  
ad 1 Liter aqua dest.  
pH 9,5

Substrat: 10ml Tris-AP-Puffer (5-fach)  
2,5ml NBT (Nitro-blue-tetrazolin)  
(fertig als Tablette, die in 10ml Wasser gelöst wird)  
250µl BCIP (5-bromo-4-chloro-2-indolylphosphat)  
(fertig als Tablette (c=5mg/ml), die in 5ml Dimethylformamid  
gelöst wird)

### Versuchsdurchführung:

Während des Blottens wurden die Proteine auf die Membran übertragen. Um restliche freie Bindungsstellen zu besetzen, wurde die Membran 60 Minuten in Magermilchpulver inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal in PBS-Tween 0,1% jeweils fünf Minuten lang gewaschen. Die großen Taschen wurden in 12 bis 15 senkrechte Streifen zerschnitten und nummeriert. Die Standards wurden beiseite gelegt.

Zur Untersuchung der Patientenserum wurde 100µl Patientenserum mit 900µl PBS-Tween versetzt und jeweils ein Streifen in je ein verdünntes Patientenserum für eine Stunde hineingelegt. Zwei Streifen wurden beiseite gelegt. Für die Positivkontrollen wurde einer davon dann in 2 µl polyklonalem Biotin-versetzten Anti-human-CD28-Antikörper (Maus) auf 10ml PBS-Tween (Positivkontrolle), der andere Streifen in 2µl monoklonalem Anti-human-IgG Fc-Fragment-Antikörper (Maus) auf 10ml PBS-Tween (Fc-Kontrolle) inkubiert. Die Inkubation aller Antikörper erfolgte, horizontal geschüttelt, eine Stunde lang.

Anschließend wurden die Streifen dreimal fünf Minuten in PBS-Tween gewaschen. Dann wurde auf dem Horizontalschüttler eine Stunde lang der zweite Antikörper inkubiert. Der in dem Biotin-versetzten Anti-human-CD28-Antikörper inkubierte Streifen wurde mit 2µl AP-konjugiertem Streptavidin und der in Anti-human-IgG Fc-Fragment inkubierte Streifen wurde in 2µl AP-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper versetzt. Die Streifen, die mit den verdünnten Patientenserum inkubiert wurden, wurden im verdünnten Sekundärantikörper, 6µl polyklonalem Anti-human-IgG-Antikörper (Kaninchen) in 20ml PBS-Tween, inkubiert.

Danach wurden die Streifen zehn Minuten in Tris-AP-Puffer gegeben und zuletzt in BCIP/NBT-Substrat zehn Minuten lang gefärbt. Nach ausreichender Farbentwicklung wurden die Membranen in destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet oder trocken gefönt.

Bei der Austitration wurde jeweils ein Streifen einer Konzentration in 2 µl polyklonalem Biotin-versetzten Anti-human-CD28-Antikörper (Maus) auf 10 ml PBS-Tween gegeben, der andere Streifen in 2µl Anti-human-IgG Fc-Fragment-Antikörper (Maus) auf 10 ml PBS-Tween inkubiert und wie die oben beschriebenen Positivkontrollen weiterverarbeitet.

Die getesteten Mengen Chimäre pro Lane bei der Austitration haben unterschiedlich starke Banden ausgeprägt. Daraufhin wurde für die weiteren Untersuchungen entschieden, welche Menge Chimäre pro Lane (1µl, 2µl, 4µl) für eine bestmögliche Beurteilung benötigt wird.

### 2.1.5 Auswertung der Immunoblots

Durch die Verdauung der CD28-Chimäre mit Trypsin, die darauf folgende Trennung der Fragmente durch die SDS-Gelelektrophorese und die anschließende Darstellung dieser Banden auf der Blottingmembran erhielt man Spaltprodukte von 78 kDa und 45 kDa, die durch Anti-human-CD28-Antikörper gebunden wurden. Sie wurden aber nicht durch Antikörper, die gegen humanes Fc oder humanes IgG gerichtet sind, erkannt. Dies konnte durch die Positivkontrollen mit Anti-Fc und humanen Anti-IgG-Antikörpern nachgewiesen werden.

Als positiv wurden Streifen mit einer deutlichen Bande an den gesuchten Stellen von 78 bzw. 45 kDa erachtet. Negativ wurden Ergebnisse beurteilt, denen diese Banden deutlich fehlten.

Die Beurteilung wurde durch drei Mitarbeiter subjektiv und unabhängig voneinander durchgeführt.

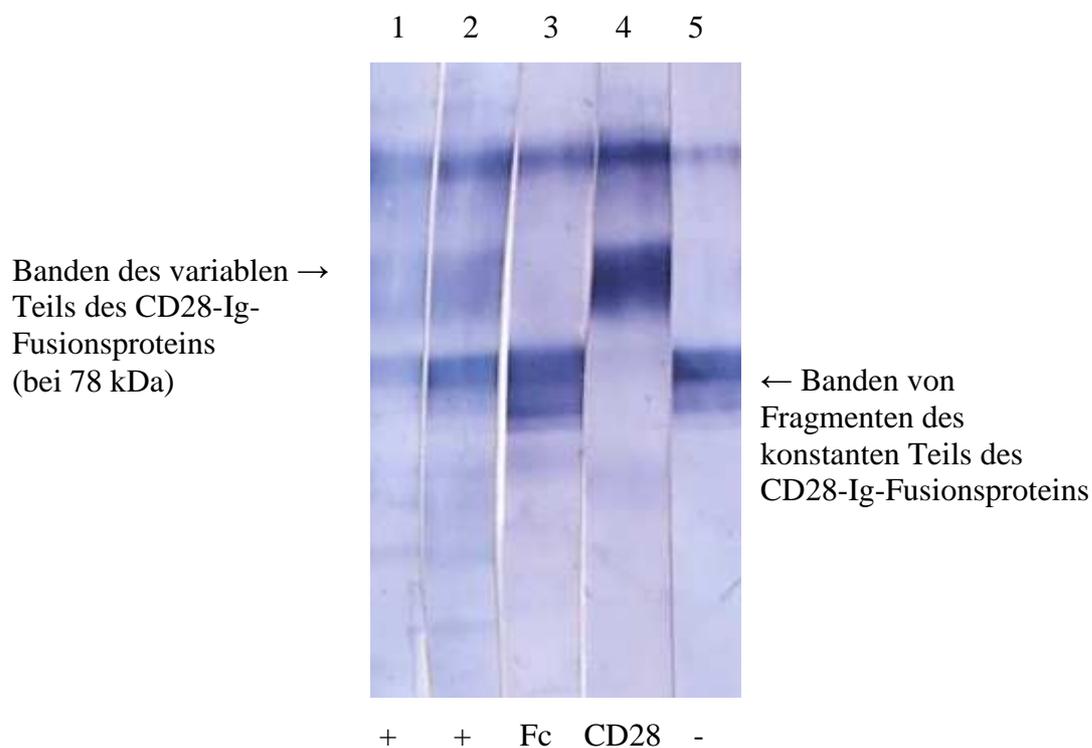


Abbildung 1: Beispiele von Immunoblots mit den Kontrollbanden für den variablen Teil des CD28-Ig-Fusionsproteins, von monoklonalen Anti-human-CD28-Antikörpern detektiert, (Positivkontrolle) (4) und für den konstanten Teil, von Anti-Fc-Antikörpern und Anti-human-IgG-Antikörpern detektiert, (Negativkontrolle) (3), sowie Beispiele für zwei positive (1 und 2) und ein negatives Ergebnis (5) aus Patientenseren.

## 2.2 Statistische Analyse

Es wurden unterschiedliche Analysen durchgeführt, um Assoziationen zwischen Erkrankungen und Autoantikörpern gegen CD28 herauszufinden. Mit dem *Wilcoxon rank sum test* konnten fortlaufende Parameter, wie das Alter oder das Serum IgE, bei Patienten mit und ohne Autoantikörper gegen CD28 verglichen werden. Dichotome Parameter, wie das Geschlecht oder Präsenz der CD28-Antikörper, wurden mit dem *Fisher's exact test* verglichen. Logistische Regressionsanalysen wurden zur Identifizierung von Faktoren, die jeweils von der Präsenz der CD28-Autoantikörper abhängig sein könnten, unternommen. Die Korrektur nach *Bonferroni* wurde verwendet, um Einflüsse durch die Testung auszugleichen.

## 2.3 Proliferationsassay zum Nachweis der Stimulation von T-Lymphozyten durch humane Anti-CD28-Autoantikörper in einem Modell der Anergie

### 2.3.1 Herstellung der Poolseren

Zunächst wurden vier Poolseren hergestellt, die aus Serungemischen zu je gleichen Teilen unterschiedlicher Qualität bestanden.

Serum von Patienten mit AD mit Autoantikörpern gegen CD28

Serum von Patienten mit AD ohne Autoantikörper gegen CD28

Serum von gesunden Patienten mit Autoantikörpern gegen CD28

Serum von gesunden Patienten ohne Autoantikörper gegen CD28

### 2.3.2 Reinigung der CD28-Autoantikörper aus den Poolseren

Bevor der Nachweis der Stimulation von T-Lymphozyten durch humane Anti-CD28-Autoantikörper erbracht werden konnte, wurden Serungemische aus Patientenseren unterschiedlicher Qualität angefertigt. Aus diesen Serungemischen wurden Eluate hergestellt, so dass man die Fraktion mit den Antikörpern gegen CD28 und gegen humanes Fc erhielt. Die Autoantikörper gegen CD28 wurden mit Hilfe von Protein G Dynabeads [Dynal, Oslo, Norwegen] von den Patientensera separiert. Für die Separation wurden zunächst 100 µl des verdauten CD28-Ig-Fusionsproteins zu 200 µl Dynabeads Lösung hinzugefügt und für 40 Minuten auf den Rotationsmixer gegeben. Die beads wurden in 1 ml PBS zweimal gewaschen

und magnetisch getrennt. Nach der Trennung wurden die beads in 500µl einer 0,1 molaren PBS Lösung mit einem pH-Wert von 7,0 wieder suspendiert. Die Kreuzvernetzung des markierten CD28-Proteins erfolgte mit einer Lösung von 20 mM Dimethylpimilidat in 0,2 molarem Triethanolamin. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten auf einem Rotationsmixer bei Raumtemperatur und wurde dann durch Zugabe von 1 ml 50 mmolarem Trispuffer (pH 7,5) für 15 Minuten gestoppt.

Die Herstellung der Eluate aus den Serumgemischen erfolgte mithilfe der beladenen Beads. Dazu wurden sie zunächst dreimal in PBS mit 0,1% Tween gewaschen, jeweils 300µl eines gepoolten Serum den Beads hinzugefügt und für 45 Minuten auf dem Rotationsmixer inkubiert. Das Serum wurde wieder abgegossen, die Beads zwei Mal in PBS 1% Tween gewaschen. Zur Elution der gebundenen Antikörper wurden die Antikörper in 100 µl 0,1 molaren Citratpuffer (pH 2,7) abgelöst.

Die separierten Antikörper wurden dann bei -20°C in 0,1% Tween gelagert.

#### 2.4 Gemischte lymphozytäre Reaktion (*mixed lymphocyte reaction*)

Raji- und Jurkatzellen wurden freundlicherweise von Prof. Guse (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640, einem gängigen Zellkulturmedium, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde, gehalten. Eine gemischte lymphozytäre Reaktion (MLR) wurde initiiert, indem Jurkatzellen ( $10^4$  Zellen/ml) zusammen mit frisch bestrahlten (30 Gy) Rajizellen ( $10^4$  Zellen/ml) kultiviert wurden, wie in <sup>118</sup> beschrieben. Gereinigte Sera (50µl) und 4 µl CTLA-4-Ig wurden am Tag Null der Kultur nach einem Ansatzschema hinzugefügt.

	AD-Serum+	AD-Serum-
Raji + Jurkat		
Raji+Jurkat+ PHA*		
Raji+Jurkat+CTLA-4-Ig		
Raji+Jurkat+PHA+CTLA-4-Ig		

\*Phytohämagglutinin, 1 µg/ $10^6$  Zellen

Der Ansatz wurde zwei Tage lang bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet.

Nach drei Tagen wurde 5-Bromo-2'-Deoxyuridin hinzugefügt und der Einbau dieser Substanz in die DNA proliferierender Zellen nach Vorschrift ermittelt (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Roche, Mannheim). Dazu wurden fünf Stunden nach der Zugabe von BrdU die Zellen mithilfe einer Nadel aufgenommen und luftgetrocknet. Danach wurde FixDenat (gebrauchsfertig, Fa. Roche, Mannheim) hinzu gegeben und für 30 Minuten auf dem Rotationsmischer inkubiert. Nachdem mit einer Tap-Mikroplatte FixDenat entfernt wurde, wurden die Zellen mit Peroxidase-konjugierten Anti-BrdU-Antikörpern (Anti-BrdU-POD) für 30 Minuten auf dem Rotationsmischer inkubiert. Danach wurden die Mikroplatten drei Mal à 15 Minuten auf dem Rotationsmischer gewaschen. Das Substrat (TMB, gebrauchsfertig, Fa. Roche, Mannheim) wurde ebenfalls für 15 Minuten auf dem Rotationsmischer inkubiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines *ELISA plate readers*.

## 2.5 Patienten und Kontrollpersonen

Die Serumproben stammen von einer Gruppe randomisiert selektierter Patienten (n=196), die an unterschiedlichen entzündlichen und nicht-entzündlichen Hautkrankheiten leiden. Sie wurden im Zeitraum zwischen 2001 und 2002 an der Hautklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf behandelt.

Alle Patienten mit atopischem Ekzem (n=16) waren am extrinsischen Subtyp<sup>184</sup> erkrankt. Die Gruppe der Patienten mit autoimmunen Erkrankungen teilte sich in zwei Patienten mit Sklerodermie, drei Patienten mit einer autoimmunen Erkrankung aus dem pemphigoiden Formenkreis und drei mit systemischem Lupus erythematosus.

Als Kontrollpersonen dienten freiwillige Blutspender (n=72), Patienten und Mitarbeiter des Universitätsklinikums Eppendorf, die zu dem Zeitpunkt gesund waren.

Die Studie wurde von einem regionalen Ethikkomitee anerkannt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von jeder Versuchsperson eingeholt.

## 2.6 Material

### 2.6.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel

Acryamide-Bis	Serva, Heidelberg; #10687
Ammonium Persulfate	Bio Rad Laboratories, München Catalog #161-0700
Anti-human-CD28-Antikörper (Maus), Biotin-versetzt, polyklonal	Fa R&D, Wiesbaden, Norderstadt #BAF 342
Anti-human-IgG Fc-Fragment-Antikörper (Maus), monoklonal	Dianova, Hamburg #209-005-103
Anti-human-IgG- Antikörper (Kaninchen) polyklonal	Sigma, Steinheim
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)_AP-konjugiert	Sigma, Taufkirchen #A-2064
Anti-Mouse-Fc AP-konjugiert	Sigma, Taufkirchen #A-1418
Aprotinin	Roche, Mannheim #236624
BCIP 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat	Sigma, Taufkirchen #B-0274
Bromphenol Blau	Sigma, Taufkirchen #B-6131
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
Chimäre	Fa R&D, Wiesbaden, Norderstadt #342-CD200
CTLA-4-Ig	Sigma, Taufkirchen
Dynabeads	Dynal, Oslo, Norwegen
Electrode Paper	Amersham Biosciences, Freiburg #80-1106-19
FACS lysing solution	Becton Dickison Bioscience, Heidelberg
FACS Permeabilisierungslösung	Becton Dickison Bioscience, Heidelberg
Glycerin Minimum 99%	Sigma, Taufkirchen #G-7757
Glycin p.A.	Serva, Heidelberg #23390
HCl Salzsäure 25%	Merck, Darmstadt #316
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad, München Catalog #161-0324
KCl	Merck, Darmstadt # 1.049.36.
Magnesiumchlorid wasserfrei	Merck, Darmstadt # 8.14733.0100

Methanol 20% v/v	Merck, Darmstadt # 1.06009.
NaCl	Merck, Darmstadt # 1.01540.
NBT (Nito blue tetrazolin Tablets)	Sigma, Taufkirchen # N-5514
Phytohämagglutinin (PHA)	z. B. Sigma
Precision Plus Protein Standards All Blue	Bio-Rad Catalog, München # 161-0373
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck, Darmstadt # 12012.
Skin Milk Powder	Fluka, Seelze/ Deisenhofen # 70166
Streptavirin AP-konjugiert	Dianova, Hamburg #016-050-084
Substrat TMB, gebrauchsfertig	Roche, Mannheim
TEMED	
(N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	Bio-Rad, München Catalog #161-0800
TLCK	Roche, Mannheim #874485
Trans-Blot Transfer Medium	
Trypsin (2,5%ig)	Roche, Mannheim #210235
PVDF Membrane (0,2mm)	Bio-Rad, München Catalog 162-0184
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt # 1.08382.0500
Tween 20	
Polyoxyethylenesorbitant Monolamrate	Sigma, Taufkirchen Lot 15H0929
Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden

### 2.6.2 verwendete Geräte

Durchflußzytometer FACScan	Becton Dickison Bioscience, Heidelberg
Elektrophoresis power supply, EPS 600	Pharmacia Biotec

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse des Immunoblots

##### 3.1.1 Bestimmung der geeigneten Menge Chimäremischung pro Blotspur

Nach der Spaltung der CD28-Chimäre durch Trypsin wurde zunächst die geeignete Menge Chimäremischung pro Blotspur durch Austitrieren ermittelt. In der ersten Untersuchung wurden die Mengen 2µl, 4µl und 5µl untersucht, in den weiteren Titrationen die Mengen 1µl, 2µl und 5µl. Nach der ersten Trypsinspaltung erwies sich 4µl pro Blotspur als geeignet, in den weiteren Spaltungen erwiesen sich 1-2µl pro Blotspur als günstig. Damit wurde für die großen Geltaschen, aus denen 10 Blotspuren entstanden, 20-40µl Chimäremischung verwendet.

Als geeignet wurden die Mengen befunden, mit denen sich die Banden am besten voneinander abgrenzen ließen.

##### 3.1.2 Western-Blotting als geeignete Methode zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28

Bei der Verdauung durch Trypsin entstanden Spaltungsprodukte des CD28-Ig-Fusionsproteins. Es wurde untersucht, ob mittels SDS-PAGE und Western-Blotting-Methode der Nachweis CD28-bindender Autoantikörper erbracht werden kann. Tatsächlich konnten mono- und polyklonale Autoantikörper dargestellt werden, die diese Spaltprodukte binden. Monoklonale Antikörper richteten sich allein gegen die 78 kDa Spaltungsprodukte, polyklonale Antikörper auch gegen kleinere Spaltungsprodukte von 45 kDa. Diese Antikörper waren allerdings weder in der Lage humanes Fc noch humanes IgG zu binden. Im Gegensatz dazu konnten Antikörper, die gegen humanes Fc bzw. humanes IgG gerichtet waren nur Fragmente des Immunglobulinanteils, nicht aber CD28 erkennen.

Diese Ergebnisse konnten demonstrieren, dass über eine Spaltung der CD28-Chimäre durch Trypsin Fragmente entstanden, die frei von konstanten Ig-Teilen des CD28-Fusionsproteins waren. Damit ließen sich Kreuzreaktionen zwischen zirkulierenden Antikörpern, die gegen Fc gerichtet waren, ausschließen.

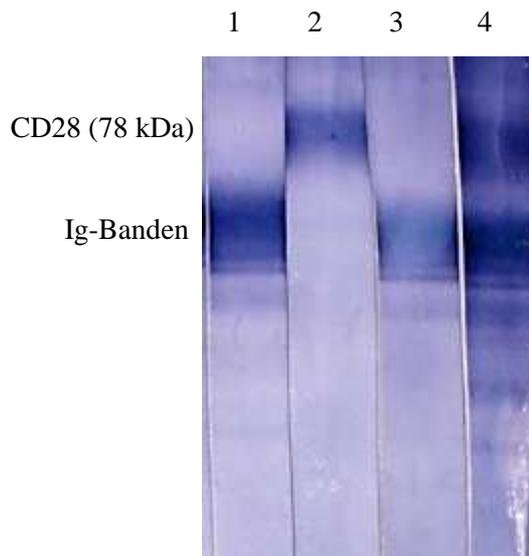


Abbildung 2: Darstellung der Banden in Immunoblots

Hier werden die Banden für CD28-Autoantikörper in den Immunoblots dargestellt. Sie finden sich hier in der Positivkontrolle für CD28 (2) und in einem positiv getesteten Beispiel (4). Sie erscheinen bei 78 kDa. In der Fc-Kontrolle (1) sind die konstanten Ig-Banden dargestellt, die sich auch in der für CD28 negativ getesteten Probe (3) wiederfinden.

### 3.1.3 Auswertung der Western-Blotting-Ergebnisse

Mithilfe der Western-Blotting-Methode war es möglich, Autoantikörper gegen CD28 nachzuweisen. Diese Methode wurde bei 196 randomisiert ausgesuchten Patienten mit unterschiedlichen entzündlichen und nicht-entzündlichen Hautkrankheiten durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten Seren von 72 gesunden Personen. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte subjektiv von drei Mitarbeitern, die die Ergebnisse unabhängig voneinander bewerteten.

Danach waren 8 von 72 (11,1%) der gesunden Personen und 53 von 196 (27,04%) der Patienten positiv für diese Antikörper.

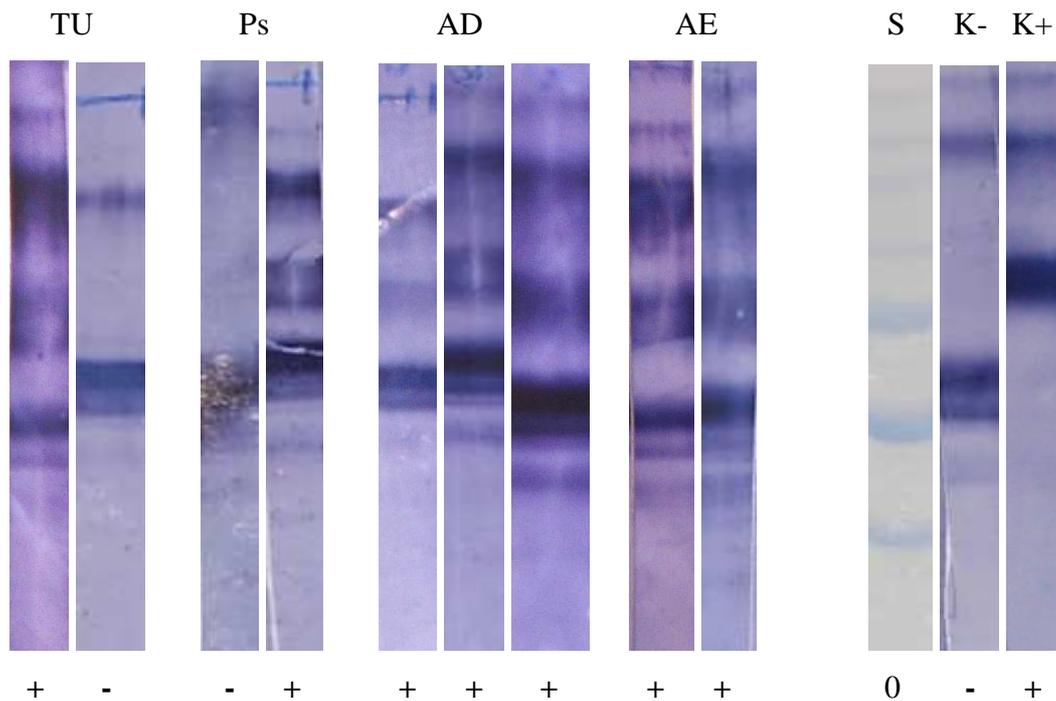


Abbildung 3: Immunoblots in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen

Hier sind Immunoblots von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen dargestellt. Zwei Patienten mit Tumorerkrankungen (TU) wie Basaliom und Malignes Melanom, ein Patient mit, der andere ohne Autoantikörper gegen CD28. Der eine an Psoriasis (Ps) erkrankte Patient ist Autoantikörper-negativ, der andere -positiv. Die Immunoblots der an AD erkrankten Patienten sind für Autoantikörper gegen CD28 positiv. Die beiden Beispiele für Autoantikörper gegen CD28 bei autoimmunen Erkrankungen (AE) sind einmal das Sharp-Syndrom und Morphea, die beide positiv erscheinen. Weiterhin sind ein Standard (S) und jeweils eine Positiv (K+)- sowie eine Negativkontrolle (K-) aufgeführt.

## 3.2 Statistische Auswertungen

### 3.2.1 Korrelation der Autoantikörper gegen CD28 hinsichtlich Alter und Geschlecht

Die Beziehung des Alters wurde mithilfe des *Wilcoxon rank sum test* ermittelt. Um einen Zusammenhang des Geschlechtes nachzuweisen, wurde der *Fisher's exact test* verwendet.

In der randomisierten Patientengruppe sowie in der Kontrollgruppe zeigte sich bei CD28-Autoantikörper-positiven Personen ein Trend hin zu jüngerem Alter, ohne nachweisbare Signifikanz ( $p > 0,05$ ). Bei einem leichten Überwiegen der weiblichen Personen, ergab sich ebenfalls keine signifikante Relation ( $p > 0,05$ ) zwischen Autoantikörper gegen CD28 und Geschlecht.

	CD28+	CD28-	p
Alter [Jahren]	(±SD) 52.3 ± 18.8	58.7 ± 19.9	0.073
Geschlecht			
männlich	19	69	
weiblich	34	74	0.146

Tabelle 1. Alter und Geschlecht in Bezug zu Anti-CD28-Autoantikörpern

Die erste Zeile stellt die Altersverteilung CD28-Autoantikörper-positiven und CD28-Autoantikörper-negativen Personen dar. In der zweiten Zeile ist die Verteilung der Autoantikörper hinsichtlich des Geschlechts zu sehen.

SD: Standardabweichung

### 3.2.2 Assoziationen der Autoantikörper gegen CD28 zu verschiedenen Erkrankungen

Die Atopische Dermatitis ( $p < 0.0001$ ) sowie die allergische Rhinitis/Asthma ( $p < 0.0001$ ) scheinen hochsignifikant mit Autoantikörpern gegen CD28 zu korrelieren. Es zeigte sich auch, dass Autoimmunerkrankungen, wie Sklerodermie/Morphea und das Sharp-Syndrom, eng mit CD28-Autoantikörpern assoziiert sind ( $p < 0.01$ ).

Dagegen lassen Tumorerkrankungen der Haut, wie das Maligne Melanom und nicht-melanomatöse Hauttumore, keine Beziehung zu Autoantikörpern gegen CD28 erkennen. Ebenfalls bei Erkrankungen wie Psoriasis und anderen entzündlichen Hautkrankheiten oder auch kutanen Infektionen lässt sich keine Verbindung zu CD28-Autoantikörpern feststellen. Auch eine Assoziation zwischen CD28-Autoantikörpern und Patienten mit Ulcera an den Beinen ist nicht signifikant (Tabelle 2).

	Total	anti- CD28+	Anti- CD28-	Odds- Ratio	95% KI	p*
Gesunde Kontrollen	72	8	64	-	-	-
Atopische Dermatitis	16	14	2	56,00	28,4-110,4	<0,0001
Allergische Rhinitis/ Asthma	54	31	23	10,78	5,39-21,55	<0,0001
Autoimmune Erkrankungen	8	5	3	13,33	5,72-31,1	<0,01
Kutanes Lymphom	3	1	2	4,00	0,71-22,5	n.s.
Nicht-melanomatöse Hauttumore	27	9	18	4,00	1,72-9,30	n.s.
Beinulcera	53	13	40	2,60	1,16-5,82	n.s.
Kutane Infektionen	24	5	19	2,11	0,76-5,82	n.s.
Andere entzündliche Hauterkrankungen	49	10	39	2,05	0,87-4,83	n.s.
Psoriasis	9	1	8	1,00	0,14-7,10	n.s.
Malignes Melanom	11	1	10	0,80	0,11-5,79	n.s.

Tabelle 2: Auswertung der Autoantikörper bei verschiedenen Erkrankungen

Hier ist die Relevanz der CD28-Autoantikörper bei verschiedenen dermatologischen Erkrankungen aufgelistet. Pro Zeile ist ein Erkrankungsbild dargestellt. In den Spalten zeigen sich jeweils die Anzahl der CD28-Autoantikörper-positiven Personen, der CD28-Autoantikörper-negative Personen, die Odds-Ratio, das 95% Konfidenzintervall (95%-KI) und die Signifikanz in p\* (Bonferroni-korrigierter p-Wert, errechnet durch den Fisher exact test), n.s.: nicht signifikant. Die Werte basieren auf den Ergebnissen, die mithilfe der Western-Blotting-Methode erhoben wurden.

### 3.2.3 Logistische Regressionsanalyse der Faktoren, die Autoantikörper gegen CD28

beeinflussen

Einige der bisher getesteten Faktoren beeinflussen sich gegenseitig, wie z.B. Serum-IgE, AD oder allergisches Asthma/Rhinitis. Hierzu wurden multivariante logistische Regressionsanalysen durchgeführt. Davor wurde zusätzlich eine Bestimmung der IgE-Werte in den Patientenseren sowie in der Kontrollgruppe unternommen. Die Werte für IgE sollen an dieser Stelle als bekannt vorausgesetzt werden. IgE wurde integriert, nachdem die hohe Signifikanz für CD28-Autoantikörper bekannt war, da es ein mögliches Endprodukt durch die

Stimulation der CD28-Autoantikörper darstellt. Durch die logistischen Regressionsanalysen stellte sich die Assoziation zwischen CD28-Autoantikörpern und AD ( $p=0,0004$ ) sowie allergischer Rhinitis/ Asthma ( $p=0,02$ ) hoch signifikant dar. Auch die Assoziation zu autoimmunen Erkrankungen war signifikant ( $p= 0.014$ ). Dagegen konnte eine signifikante Relation zwischen CD28-Autoantikörpern und Alter, Geschlecht sowie Serum-IgE ausgeschlossen werden.

Faktor	Odds-Ratio	95%-KI	P
Alter	0,993	0,974-1,102	0,443
Geschlecht	1,073	0,503-2,288	0,855
IgE kU/l	0,999	0,999-1,000	0,077
allergische Rhinitis/Astma	2,484	1,139-5,417	0,022
Atopische Dermatitis	62,682	6,296-624,02	0,0004
Autoimmune Erkrankungen	8,909	1,572-50,48	0,014

Tabelle 3: Logistische Regressionsanalyse

Darstellung logistischer Regressionsanalysen von Faktoren, die in Zusammenhang mit Anti-CD28-Autoantikörpern gebracht werden können. IgE wurde zuvor in allen getesteten Seren bestimmt. Wieder wird die hohe Signifikanz der Autoantikörper gegen CD28 und AD erreicht. Weiterhin sind in dieser Methode ebenfalls die Autoantikörper gegen CD28 in allergischer Rhinitis/Asthma und autoimmunen Erkrankungen signifikant. Keine Korrelation ist zwischen CD28-Autoantikörpern und Alter, Geschlecht und IgE-Wert ersichtlich.

### 3.3 Testungen der immunologischen Relevanz der Anti-CD28-Autoantikörper

Um eine immunologische Relevanz der Anti-CD28-Autoantikörper feststellen zu können, wurde eine gemischte lymphozytäre Reaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) mit bestrahlten Raji-Zellen und Jurkat-Zellen verwendet. Dazu wurden die CD28-Autoantikörper aus positiven Seren eluiert, die von Patienten mit atopischer Dermatitis stammten. Die Negativkontrolle bildeten Eluate aus Seren von Patienten mit atopischer Dermatitis, die CD28-Autoantikörper-negativ waren. Die Zellen wurden zunächst zwei Tage kultiviert. Danach wurde BrdU hinzugefügt und die Proliferation über den Einbau der Substanz

gemessen. Am dritten Tag konnten geeignete Ergebnisse erhoben werden. Durch Seren, die CD28-Autoantikörper enthielten, konnte die Lymphozytenproliferation signifikant angeregt werden. CD28-Autoantikörper-freie Seren führten dagegen zu einer deutlich verminderten Proliferation.

CTLA-4-Ig erwies sich als geeigneter Inhibitor, da es in einem Modell für die Hemmung der T-Zell-Proliferation in einer MLR bereits gut etabliert werden konnte<sup>118,185</sup> und CTLA-4 als regulierender Faktor in Anergie beschrieben ist<sup>132</sup>. Auch in diesem Versuch wurde die Lymphozytenproliferation deutlich gehemmt (Abbildung 4). Eluate aus Seren, die Antikörper gegen CD28 enthielten, konnten trotz CTLA-4 eine stärkere Lymphozytenproliferation hervorrufen und damit die hemmende Wirkung des CTLA-4 übergehen. Dies gelang CD28-Autoantikörper-freien Eluaten nicht (Abbildung 4). Diese Ergebnisse weisen die Potenz der Autoantikörper gegen CD28 nach, eine Lymphozytenproliferation in diesem Modell der Anergie zu induzieren.

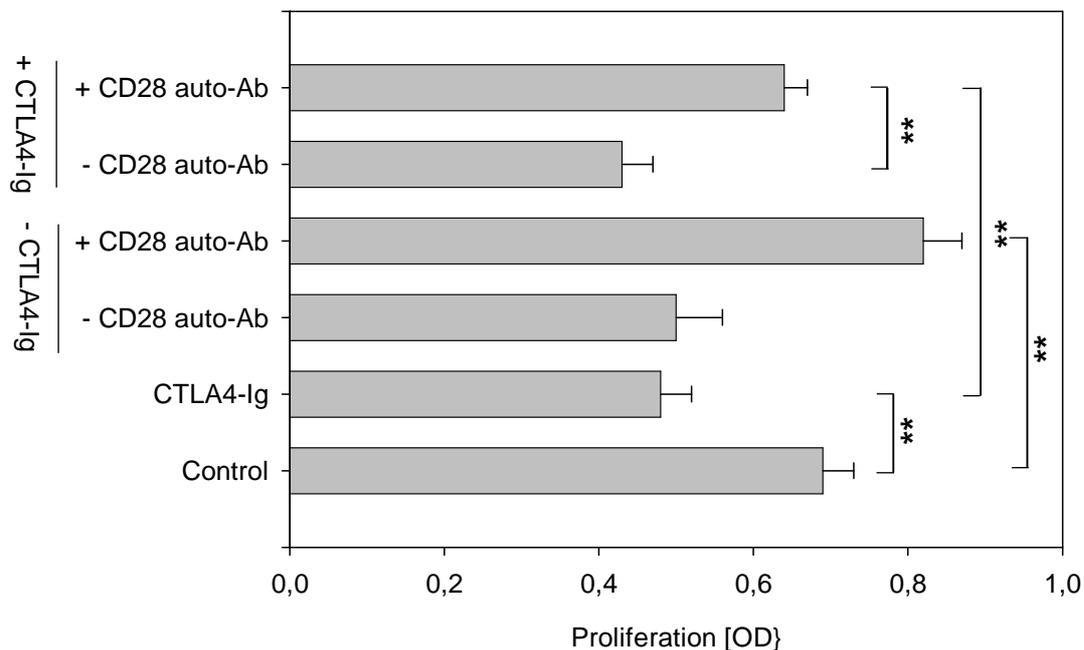


Abbildung 4: Gemischte lymphozytäre Reaktion, MLR

Die MLR wurde mit bestrahlten Raji-Zellen und Jurkat-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen die Proliferation nach Stimulation im Verhältnis zu der spontanen Proliferation (Kontrolle). CTLA-4-Ig inhibiert die Proliferation, CD28-Autoantikörper-haltige Eluate sind dagegen in der Lage, die T-Zell-Proliferation signifikant zu stimulieren. Die Costimulation durch CTLA-4-Ig und CD28-Autoantikörper resultiert in einer geringeren Hemmung der Jurkat-Zell-Proliferation,  $p^{**} < 0.01$  (signifikant hinsichtlich der Kontrolle).

## 4. Diskussion

In der folgenden Diskussion sollen unsere Untersuchungsmethoden und -ergebnisse auf mögliche Fehlerquellen hin überprüft und alternative bzw. ergänzende Forschungsansätze erörtert und bewertet werden. Unter Berücksichtigung anderer Forschungsergebnisse soll im Besonderen auf den Zusammenhang zwischen CD28-Autoantikörper und atopischen sowie autoimmunen Erkrankungen eingegangen werden.

### 4.1 Diskussion der Fehlermöglichkeiten

Als eine geeignete Methode, Autoantikörper gegen CD28 nachzuweisen, erwies sich die Western-Blotting-Methode nach Spaltung eines CD28-Fusionsproteins durch Trypsin. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte konnten nach Inkubation in Patientenseren Banden bei 78 kDa bzw. 45 kDa sichtbar gemacht werden. Dies geschah bei einer Verdünnung von 100µl Serum auf 900µl PBS-Tween, was sich für diese Methode als günstig erwies. Es ist davon auszugehen, dass die Autoantikörper gegen CD28 in unterschiedlicher Konzentration in den verschiedenen Seren vorhanden sind. Das bedeutet, dass die Verdünnung der Seren eine Rolle in der Nachweisbarkeit spielen könnte. Folglich würde eine Veränderung in der Verdünnung die Anzahl positiver Seren und damit eventuell das Gesamtergebnis verändern.

Zu diskutieren ist ferner das Vorgehen bei der Spaltung mit Trypsin. Es ist wichtig, die genaue Inkubationszeit einzuhalten, um die gleiche Anzahl der Spaltprodukte zu erhalten. So könnte es sein, dass eine längere Inkubationszeit zu einer vermehrten Spaltung der Chimäre führt. Dies hätte wiederum einen Einfluss auf die Anzahl der Fragmente, die von den Autoantikörpern gegen CD28 gebunden werden. Schließlich würde dies auch die Anzahl positiver Seren beeinflussen. Durch möglichst genaues Einhalten der Inkubationszeiten ist dieses Risiko als gering einzuschätzen.

Khatlani et al.<sup>15</sup> konnten mit Hilfe des *enzym linked immunosorbent assay* (ELISA) Autoantikörper gegen CTLA-4 in Hunden nachweisen. In einer wiederholten Testung der Seren mithilfe des Immunoblots waren allerdings weniger Seren positiv. Das unterschiedliche Ergebnis wurde mit einer möglichen Denaturierung des Fusionsproteins in der SDS-PAGE

erklärt. Diese Beobachtungen könnten auch auf unsere Untersuchungen übertragen werden. Es wäre daher lohnenswert, diese Untersuchungen mit ELISA zu wiederholen.

Es muss auch auf die mögliche Ungenauigkeit bei der subjektiven Auswertung der Immunoblots hingewiesen werden. Die Immunoblots wurden von drei Mitarbeitern unabhängig voneinander bewertet. Das Gesamtergebnis wurde zwar aus den jeweils gemittelten Ergebnissen errechnet, dennoch bleibt festzustellen, dass auf diese Weise grenzwertige Immunoblots fehlerhaft beurteilt werden konnten.

#### 4.2 Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28

Die Costimulation von CD28 ist einer der wichtigsten T-Zell-Signalwege. CD28 ist in eine Reihe von T-Zell-Antworten einbezogen, einschließlich der T-Zell-Proliferation, der IL-2-Produktion, der Prävention von Anergie sowie der Induktion des anti-apoptotischen Faktors Bcl-xL. Darüber hinaus beeinflusst CD28 B-Zellen und die Balance zwischen Th1- und Th2-Zellen. Zudem ist CD28 für die Produktion einer Reihe von Zytokinen verantwortlich.

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Verdauung von CD28-Chimären durch Trypsin. Die gewonnenen Spaltprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Western-Blotting-Methode durch Antikörper detektiert. Nach Inkubation mit randomisiert ausgesuchten Patientenseren fielen Banden von Antigenen bei 78 kDa bzw. bei 45 kDa auf, und zwar genau die Stellen, die von Anti-CD28-Antikörpern als Positivkontrolle demarkiert wurden. Dagegen konnten die Antigene in diesem Bereich von Antikörpern gegen den Fc-Teil bzw. gegen humanes IgG nicht gebunden werden. Das ließ den Schluss zu, dass diese monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörper ausschließlich gegen CD28 und nicht gegen andere Oberflächenproteine oder Teile von Immunglobulinen gerichtet waren. Somit konnten mit dieser Methode erstmals Autoantikörper gegen CD28 nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse erbrachten, dass bei 27% der Patienten mit entzündlichen und nichtentzündlichen Erkrankungen Autoantikörper gegen CD28 nachweisbar waren. Demgegenüber waren Autoantikörper nur bei 11% der Kontrollgruppe vorhanden. Dabei kommt die Frage auf, warum diese Autoantikörper immerhin bei 11% der Kontrollgruppe, also bei vermeintlich gesunden Individuen, auftraten. Dies könnte sich dadurch erklären lassen, dass sich diese Menschen nicht in hautärztlicher Behandlung befanden, aber durchaus unerkant an Hauterkrankungen leiden könnten oder die Krankheit noch nicht symptomatisch war. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass unbekannte Isoforme der

Autoantikörper gegen CD28 existieren, die nicht pathogen wirken. Schließlich ist auch zu bedenken, dass viele Erkrankungen multifaktorielle Ätiologien besitzen. Die Autoantikörper können also als Prädispositionsfaktoren für Krankheiten gesehen werden, denen noch weitere Faktoren zum Ausbrechen der Krankheit fehlen.

Schließlich stellte sich die Frage, ob es spezielle Hauterkrankungen oder andere Parameter gibt, die signifikant mit den Autoantikörpern korrelieren.

#### 4.3 Autoantikörper gegen CD28 und Atopie

Allergische Rhinitis, atopische Dermatitis und allergisches bronchiales Asthma sind Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis. Die Kardinalsymptome dieser Erkrankungen basieren auf entzündlichen Veränderungen der Manifestationsorgane, wie z.B. der Atemwege bei allergischem Asthma. Eine zentrale Rolle hierbei spielt die Involvierung der T-Zellen und deren weitere Differenzierung<sup>19</sup>. Die Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL10, IL13 und GM-CSF sind u.a. für die charakteristischen pathophysiologischen Veränderungen des atopischen Phänotyps verantwortlich. Th1-Zellen, die hauptsächlich IFN- $\gamma$  und IL-2 exprimieren, sind dem untergeordnet und sind eher in der chronischen Phase aktiv<sup>186,187,188</sup>. Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 spielen eine große Rolle bei der Eosinophilie und dem Wechsel der B-Zellen vom IgG- zum IgE-Isotyp bei atopischen Erkrankungen<sup>189</sup>. Ein entscheidender Faktor für die Dominanz der Th2-Zytokine scheint das Zytokinprofil zu sein. Dies wird vermutlich über APZ beeinflusst, die costimulatorische Signale von CD28 oder CTLA-4 erhalten haben.

Wie einige Untersuchungen zeigen, spielt der CD28/B7-Signalweg in der Regulation der Th1/Th2-Zellbalance eine wesentliche Rolle. Durch die Involvierung von CD28 wird die Produktion von IL-2, aber auch des Th2-Zytokins IL-4 angeregt<sup>190</sup>. Dass für die Th2-Antwort eine kontinuierliche Stimulation über CD28 benötigt wird, konnte in Tiermodellen demonstriert werden. Außerdem wurde mithilfe einer Modifikation der B7-1- und B7-2-Moleküle an peripheren B-Zellen die IgE-Produktion in Mäusen verhindert<sup>191,192</sup>, was als Hinweis für die Involvierung der costimulatorischen Moleküle bei atopischen Erkrankungen spricht. Eine erhöhte Serumkonzentration costimulatorischer Moleküle konnte mit unterschiedlicher Gewichtung bei atopischen Erkrankungen nachgewiesen werden, eine Erhöhung von CD28, CTLA-4 und B7-2 (CD86) bei Asthma<sup>19</sup>, beider B7-Moleküle bei atopischer Dermatitis<sup>193</sup>. Im Beisein von Anti-CD28 waren die Zellproliferation und die IgE-

Produktion in anti-CD40+ IL-4-stimulierten peripheren mononukleären Zellen von Patienten mit AD signifikant erhöht. Das unterstreicht ebenfalls die Annahme, dass CD28 in der Th-2-vermittelten Entzündungsreaktion involviert ist<sup>193</sup>. Mathur et al. konnten in Mäusen demonstrieren, dass Interaktionen von CD28 mit B7-1 oder B7-2 ausreichen, eine allergische Infektion der Luftwege zu erzielen<sup>194</sup>.

Diese Aussagen weisen CD28 eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen zu und unterstreichen damit die Ergebnisse dieser Arbeit. Es konnte nach statistischen Analysen (*Fisher's exact test* und logistischer Regressionsanalyse) eine hochsignifikante Assoziation der Autoantikörper gegen CD28 zu den atopischen Erkrankungen, wie der atopischen Dermatitis und weniger deutlich der allergischen Rhinitis und Asthma, dargestellt werden. Möglicherweise stimulieren diese Autoantikörper die Costimulation durch CD28 und steigern somit Mechanismen wie die Th2-Zytokinproduktion oder eine Eosinophilie bei atopischen Erkrankungen. Experimentelle Studien an kutaner Leishmaniose<sup>195</sup>, aber auch Tiermodelle von allergischen Erkrankungen der Luftwege, bei denen CD28 eine essentielle Rolle der Induktion von Th2-Zytokinen nachgewiesen wurde, können diese Annahme unterstreichen. Die Zytokine verursachten konsekutiv eine Eosinophilie und bewirkten, dass sich eine Überempfindlichkeit der Luftwege etablierte. Dabei schien die Interaktion CD28/B7-2 der wesentliche costimulatorische Signalweg zu sein, der allergische Reaktionen auslöst<sup>196</sup>.

Eine enge Verbindung von Allergie und costimulatorischen Molekülen fanden auch Howard et al.<sup>197</sup> heraus. In dieser Arbeit wurde eine Region im Chromosom 2q33 entdeckt, die mehrere Gene enthält, die für allergische Immunantworten, Asthma oder beides verdächtig erscheinen. Mit Hilfe der Genanalyse von CD28 und CTLA-4 konnten einige Veränderungen der Genstruktur identifiziert werden, die mit Asthma und Allergie assoziiert waren. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Ätiologie der atopischen Erkrankungen eng mit den costimulatorischen Molekülen und besonders mit CD28 verknüpft ist. Folglich könnten Manipulationen des CD28-Signalwegs eine neue therapeutische Methode in der Behandlung von allergischen Erkrankungen darstellen. Eine Blockierung dieses costimulatorischen Weges wäre beispielsweise geeignet, allergische Symptome zu unterdrücken. Das konnte bereits in Versuchen demonstriert werden, in denen blockierende monoklonale Antikörper gegen B7-2 (CD86) zu einer Hemmung des spezifischen IgE, der pulmonalen Eosinophilie und der Überempfindlichkeit der Luftwege bei Asthma von Mäusen geführt hat<sup>19</sup>. Durch seine inhibitorische Wirkung auf den CD28-Signalweg, speziell auf die PI3-K und auf der Ebene der Tyrosinphosphorylierung, kommt auch IL-10 als ein blockierender Faktor in Frage<sup>198</sup>.

Hinsichtlich unser Ergebnisse wäre dies ein Mechanismus, der die Wirkung der Autoantikörper gegen CD28 beeinflussen und sogar eine mögliche Therapie für atopische Erkrankungen darstellen könnte. Dazu wäre es lohnenswert, die Wirkung von IL-10 gegen CD28-Autoantikörper näher zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte eine hochsignifikante Korrelation von Autoantikörpern gegen CD28 mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises gezeigt werden. Sofern diese Autoantikörper auch schon vor dem Auftreten erster Symptome im Serum vorhanden wären, könnte diese hier etablierte Methode ein möglicher Früherkennungstest für atopische Erkrankungen darstellen. Zudem könnten die Autoantikörper gegen CD28 eine therapeutische Möglichkeit oder sogar ein präventiver Ausgangspunkt sein.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum die hier nachgewiesenen Autoantikörper gegen CD28 nicht bei 100% der Patienten mit atopischen Erkrankungen zu finden sind. Am ehesten lässt sich dies mit der multifaktoriellen Ätiologie dieser Erkrankungen erklären. So muss man sich vorstellen, dass erst eine bestimmte Kombination von Faktoren, die von Individuum zu Individuum verschieden ist, die Krankheit symptomatisch werden lässt.

Es muss noch auf die Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse hingewiesen werden. Dabei zeigte sich eine Assoziation der Autoantikörper gegen CD28 und AD mit einer Signifikanz von  $p=0.0004$ , bei allergischer Rhinitis/Asthma von  $p=0.022$ , also geringer. Dies lässt sich u. a. durch den bedeutsamen Zusammenhang zwischen den Inhalations-Antigenen, den Langerhanszellen der Haut, dem lymphozytären Infiltrat und der Entstehung der atopischen Dermatitis<sup>150,199,200,201,202</sup>, der bei allergischer Rhinitis/ Asthma nicht zu finden ist, erklären. Also scheinen diese Autoantikörper besonders im ätiologischen Zusammenspiel der Faktoren bei der AD eine Rolle zu spielen. Die Unterschiede können jedoch auch durch die Auswahl der relativ kleinen Patientengruppe zustande gekommen sein.

#### 4.4 Autoantikörper gegen CD28 bei autoimmunen Erkrankungen

Die Fähigkeit, zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden, ist für das funktionierende Immunsystem wesentlich. Das Versagen der Autotoleranz von T-Lymphozyten kann sich durch Auftreten von Autoimmunkrankheiten äußern, bei denen Gewebeschäden durch zellvermittelte Immunreaktionen verursacht werden. Anomalien von T-Helferzellen können zudem zur Produktion von Autoantikörpern führen, da CD4+ T-Lymphozyten für die Bildung

hoch affiner Antikörper gegen Proteinantigene unerlässlich sind<sup>1 (S.460)</sup>. Ein sehr interessanter Aspekt der Funktion von CD28 ist dessen Einfluss auf die CD4+-T-Zell-Differenzierung in Th1-Zellen und Th2-Zellen. Th1-Zellen vermitteln eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ und induzieren eine entzündliche Immunantwort, die mit Autoimmunität und Transplantation assoziiert ist. Th2-Zellen unterstützen B-Zellen und haben eine protektive Rolle bei Th1-vermittelten Autoimmunkrankheiten<sup>203</sup>. In einem Mausmodell eines antikörperabhängigen Lupus-ähnlichen Autoimmunsyndroms konnte der CD28-Costimulation mit konsekutiver Th2-Zellproliferation eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie nachgewiesen werden<sup>204</sup>.

Unsere Ergebnisse erwiesen eine signifikante Assoziation zwischen Anti-CD28-Autoantikörpern und autoimmunen Erkrankungen wie Sklerodermie/Morphea (zu den Kollagenosen gezählte, chronisch-entzündliche Erkrankung des Bindegewebes von Haut, inneren Organen und Gefäßen) oder Sharp-Syndrom (Überlappungssyndrom mit Symptomen verschiedener Kollagenosen, mindestens zwei nachweisbaren Kollagenosen und positiven Anti-U1-RNP-Antikörpern)<sup>205</sup>. Gleichfalls konnte ein Zusammenhang zwischen stimulierenden Autoantikörpern gegen CD28 und autoimmunen Erkrankungen in einer Untersuchung bei Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) nachgewiesen werden. Dabei waren T-Zellen von erkrankten Patienten deutlich sensibler gegen die CD28-Autoantikörper als T-Zellen in der Kontrollgruppe<sup>206</sup>. Eine Arbeit, in der die Expression von CD28 auf T-Zellen in rheumatoider Arthritis (RA) *in vivo* untersucht wurde, konnte auch auf einen Zusammenhang zwischen CD28 und RA hinweisen<sup>207</sup>. Die Rolle von CD28 ist aber längst nicht eindeutig. In Untersuchungen an *non obese Diabetes mellitus* (NOD) und Lupus-ähnlich erkrankten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Immunantworten eine feine Balance zwischen verschiedenen Signalen darstellen und unvorhersehbare Ergebnisse bei immunen Manipulationen in komplexen Autoimmunerkrankungen zu erwarten sind. Die Blockade des CD28/B7-Signalwegs beeinflusste darin die Zytokin-Balance und verhinderte damit autoimmune Erkrankungen oder brachte sie zum Ausbruch. Denn obwohl die Hemmung der Th2-Zytokine über eine CD28/B7-Blockade antikörpervermittelte Erkrankungen wie SLE verhindern konnten, führten sie zu einer Exazerbation Th1-vermittelter Erkrankungen wie den autoimmunen Diabetes mellitus<sup>208</sup>.

Über eine Einflussnahme auf CD4+CD25+-T-Zellen (Tregs) kann CD28 auf die Pathophysiologie autoimmuner Erkrankungen wie den autoimmunen Diabetes mellitus wirken. In einer Arbeit von Bour-Jordan et al. wurde den CD28-kontrollierten Tregs eine regulatorische Rolle in autoimmunem Diabetes nachgewiesen. Eine Hemmung des CD28/B7-

Signalwegs führte zu einer konsekutiven Dezimierung der Tregs und zu einer Verschlimmerung des Diabetes<sup>209</sup>. Also könnte durch inhibitorische oder auch stimulatorische Autoantikörper gegen CD28 eine Verschiebung des Gleichgewichtes stimulierender und hemmender Faktoren bewirkt werden, so dass es zu einem Ausbruch des autoimmunen Diabetes käme. Dies wäre ein möglicher Weg der in dieser Arbeit dargestellten CD28-Autoantikörper, autoimmune Erkrankungen zu induzieren. Es muss jedoch bedacht werden, dass solch komplexe Autoimmunkrankheiten von weiteren Faktoren beeinflusst werden und daher kein eindeutiges Urteil über die Rolle der Autoantikörper gegen CD28 gefällt werden kann. Andere costimulatorische Moleküle wie CTLA-4 und B7-1 und B7-2 scheinen ebenfalls in der Induktion und Aufrechterhaltung von autoimmunen Erkrankungen bedeutsam zu sein<sup>208</sup>. Auch andere Mechanismen wie Zell-Zell-Kontakte von CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-T-Zellen konnten in autoimmunen Erkrankungen nachgewiesen werden<sup>210</sup>. Es wurde von CD4<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>-Zellen berichtet, die mit einer reduzierten CD28-Stimulation Zytokine induzierten und so das Ausbrechen einer autoimmunen Erkrankung am Beispiel des Sjögren-Syndroms der Maus verhinderten<sup>211</sup>. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass der Costimulation diverse Pathomechanismen zur Verfügung stehen, um das Entstehen von autoimmunen und atopischen Erkrankungen zu beeinflussen. Sicherlich gibt es noch eine beträchtliche Anzahl ungeklärter Wege und Zusammenhänge. Welche mit den Autoantikörpern gegen CD28 in Zusammenhang stehen und damit als mögliche Therapieansätze infrage kommen, bleibt zu erforschen.

#### 4.5 Auswirkung der Autoantikörper gegen CD28 in einem Modell der Anergie

In dieser Arbeit wurde schließlich auch die immunologische Relevanz der Autoantikörper gegen CD28 in einer MLR getestet. Die Ergebnisse demonstrierten, dass Seren von Patienten mit AD, allergischer Rhinitis oder Asthma, die Autoantikörper gegen CD28 enthielten, die T-Zell-Proliferation in einer MLR signifikant erhöhen konnten. Außerdem wirkten sie aktivierend auf Lymphozyten in einem Modell der Anergie. Es konnte gezeigt werden, dass die Anti-CD28-Autoantikörper in der Lage waren, auch entgegen negativer Stimulatoren, die Zellproliferation anzuregen. Das unterstützt die Vermutung, dass Autoantikörper bei allergischen Erkrankungen, die gegen CD28 gerichtet waren, zu einer persistierenden Stimulation und erhöhten Überlebensfähigkeit von Th2-Zellen führen<sup>212</sup>. Die Tatsache, dass Anti-CD28-Autoantikörper eine CTLA-4-vermittelte T-Zell-Hemmung in einer MLR

übergehen können, zeigt, dass ein Defizit in der Th2-Zelltoleranz in AD und anderen Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis bestehen müsste. Insofern scheinen Anti-CD28-Autoantikörper in der Pathogenese atopischer Erkrankungen bedeutsam zu sein.

#### 4.6 Zusammenspiel der Anti-CD28-Autoantikörper und CTLA-4 bei atopischen und autoimmunen Erkrankungen

Eine pathogene Wirkung von CTLA-4 bei atopischen Erkrankungen konnte durch Untersuchungen nachgewiesen werden, in denen blockierende Mechanismen wie CTLA-4-Ig eine Verbesserung von allergeninduziertem Asthma bewirkten<sup>19</sup>. Van Nerveen et al.<sup>213</sup> testeten ebenfalls die Wirkung von CTLA-4-Ig. Dabei wurde gezeigt, dass die Proliferation peripherer T-Lymphozyten von Asthmapatienten, nach Provokation durch ein Allergen der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*)-Allergen) und den Kontroll-Antigenen (*tetanus toxoid* und *Candida albicans*) stark durch CTLA-4-Ig gehemmt werden konnte. CD28-spezifische monoklonale Antikörper konnten die durch CTLA-4-Ig induzierte Proliferation überwinden. Damit wurde die inhibitorische Wirkung der CTLA-4-Ig auf die Interaktion von CD28 und B7-1 bzw. B7-2 verdeutlicht. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die allergenspezifische Produktion von mRNA der Th1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ , aber auch der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5, durch CTLA-4-Ig in allergenspezifischen T-Zellen gehemmt wurde. Die Bedeutsamkeit von CTLA-4 bei atopischen Erkrankungen wird zusätzlich noch dadurch unterstrichen, dass durch eine Behandlung von Mäusen mit CTLA-4-Ig die klinischen Symptome nach einer allergischen Stimulation reduziert werden konnten<sup>214,215,216</sup>.

Neben diesen Untersuchungsergebnissen konnte auch in anderen Studien die Wirksamkeit des CTLA-4-Igs auf die bisher genannten und auf andere Zytokine, die IgE-Menge und die eosinophilen Granulozyten gezeigt werden. Außerdem konnte darin die Wirksamkeit der CTLA-4-Ig durch monoklonale Antikörper gegen CD28 übergangen werden<sup>19</sup>. In dieser Arbeit ist es gelungen, sogar durch Anti-CD28-Autoantikörper die Wirkung der CTLA-4-Ig zu übergehen. Interessant ist nun die Frage, ob und wie die Autoantikörper gegen CD28 in vivo die Pathophysiologie von Asthma und anderen atopischen Erkrankungen beeinflussen können.

Nach den oben angeführten Untersuchungsergebnissen ist CTLA-4 vermutlich in der Lage, die Wirkung der Autoantikörper gegen CD28 bei erkrankten Menschen zu unterdrücken. Dies

kann man zunächst mit dem Aufbau der Modelle erklären. Die Versuche wurden entweder *in vitro* oder an Mäusen (*in vivo*) durchgeführt. Also kann ein Einfluss über Anti-CD28-Autoantikörper, die in Mäusen vielleicht nicht vorhanden sind, gar nicht zustande gekommen sein. Ähnliches muss für *in-vitro*-Modelle gelten, in denen die T-Zellen von Serum gereinigt worden sind. Man muss außerdem bedenken, dass *in vivo* atopische und autoimmune Erkrankungen eine multifaktorielle Genese besitzen. Somit könnten bei manchen Patienten CTLA-4 und andere hemmende Mechanismen durchaus in der Lage sein, die Bildung und Wirkung der Autoantikörper gegen CD28 zu unterdrücken. Das könnte das Vorhandensein der CD28-Autoantikörper in gesunden, bzw. unsymptomatischen Patienten erklären, wie wir es in unseren Untersuchungen festgestellt haben. Bei symptomatischen Patienten nähmen dann die stimulierenden Faktoren wie die Anti-CD28-Autoantikörper überhand und inhibitorische Mechanismen würden unterdrückt.

Ob hemmende Faktoren gegen das Krankheitsgeschehen heraufreguliert werden, bleibt kontrovers. Durch Chen und Shi konnte kein Unterschied zwischen der Konzentration von CTLA-4 bei atopischen und bei nicht-atopischen Patienten mit Asthma festgestellt werden<sup>19</sup>, während andere Untersuchungen auf erhöhte Konzentrationen, besonders auch nach einer Allergeninhalation, hinweisen<sup>217,218,219</sup>.

Bemerkenswert ist jedoch, dass die Autoantikörper gegen CD28 fähig sind, die hemmenden Einflüsse durch CTLA-4-Ig zu übergehen, während eine natürliche Stimulation über CD28 allein dazu nicht in der Lage ist. Scheinbar bedienen sich diese Autoantikörper, die in Konkurrenz mit CTLA-4 stehen, einer stärkeren Affinität gegenüber den Liganden. Möglicherweise sind noch andere Signalwege durch die Anti-CD28-Autoantikörper involviert, als CD28 sie verwendet.

Letztendlich werden in der Forschung die Ätiologie und die Einflüsse bestimmter Erkrankungen nur an idealen Modellen untersucht. Aufgrund der Komplexität des menschlichen Körpers können diese Methoden aber nur Annäherungsversuche zum Gesamtbild darstellen.

Trotzdem verdient CTLA-4-Ig durch seine dominante Rolle, die T-Zell-Aktivität zu modulieren, erhöhte Aufmerksamkeit als therapeutisches Zielobjekt. Das gelöste CTLA-4-Ig agiert als ein Inhibitor des CD28-B7-Signalwegs. Es verfügt über spezifische inhibitorische Effekte in unterschiedlichen Tiermodellen bei autoimmunen Erkrankungen, Transplantatabstoßungen, Asthma und Allergie<sup>23</sup>. Es könnte daher ein möglicher Baustein in der Therapie atopischer und autoimmuner Erkrankungen und in der Transplantatabstoßung sein.

## 4.7 Schlussfolgerungen

In der oben durchgeführten Diskussion haben sich unsere Untersuchungsergebnisse als belastbar erwiesen. Insbesondere kann das gelten für die von uns festgestellte Assoziation von Anti-CD28-Autoantikörpern mit atopischen und autoimmunen Erkrankungen. Auch in anderen Untersuchungen konnte der Zusammenhang von Autoantikörpern bei atopischen Erkrankungen bestätigt werden. Es konnte beobachtet werden, dass eine beachtliche Zahl von Patienten mit AD eine Erhöhung von Autoantikörpern gegen IgE aufweist, die gegen mehrere menschliche Proteine gerichtet sind<sup>220</sup>. Darüber hinaus konnten Autoantikörper gegen IgG bei Patienten mit AD nachgewiesen werden<sup>221</sup>. Wenn die in unserer Arbeit nachgewiesenen Anti-CD28-Autoantikörper vom IgG-Subtyp sind, dann läge die Annahme nahe, dass sich Autoimmunität regelmäßig in AD ereignet. Durch dieses Ergebnis wird die Vermutung unterstützt, dass in der Ätiologie atopischer und autoimmuner Erkrankungen ein möglicher Zusammenhang besteht, der wesentlich durch die Autoantikörper gegen CD28 beeinflusst wird. Möglicherweise erkennen Autoantikörper, die jeweils in unterschiedlichen Erkrankungen synthetisiert werden, verschiedene Epitope eines rekombinanten CD28-Moleküls. Diesbezüglich scheinen weitere Untersuchungen notwendig, um neue Einblicke in die Pathophysiologie der atopischen und autoimmunen Erkrankungen zu erhalten.

Zu bedenken bleibt, dass diese Erkrankungen eine multifaktorielle Genese besitzen und CD28-Autoantikörper offenbar eine komplexe Rolle in der Pathogenese spielen. Da jedoch CD28 als ein zentraler Rezeptor bei immunologisch vermittelten Erkrankungen gesehen werden muss, lässt sich schließen, dass die hier gefundenen Autoantikörper nicht nur Serummarker für autoimmunologisch vermittelte Erkrankungen darstellen, sondern auch als wichtige Bausteine in der Diagnosefindung unterschiedlicher entzündlicher Erkrankungen fungieren könnten. Diese Vermutung wird durch die signifikanten Unterschiede zwischen allergischen und anderen entzündlichen Hauterkrankungen bereits in dieser relativ kleinen Patientengruppe gestützt.

Darüber hinaus scheint es von erheblicher Relevanz, ob diese Autoantikörper mit Schweregrad und Verlauf atopischer und autoimmuner Erkrankungen korrelieren. Das käme nicht nur der Entschlüsselung der Pathophysiologie näher, sondern eröffnete die Chance, bereits entwickelte oder noch zu entwickelnde Therapien breiter nutzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Western-Blotting-Methode erstmalig Autoantikörper nachgewiesen, die ausschließlich gegen CD28 gerichtet sind. Hierzu wurden zunächst CD28-Chimäre verdaut und die Proteine aufgetrennt. Danach wurden diese mit Seren von Patienten inkubiert, die aufgrund unterschiedlicher entzündlicher und nicht-entzündlicher Hauterkrankungen behandelt wurden. Als Kontrolle diente eine Gruppe von gesunden Serumspendern. Im Weiteren wurde ein Immunoblot durchgeführt, der deutlich machte, dass die bindenden Antikörper nur gegen den variablen Teil des CD28 binden und nicht an den Fc-Teil bzw. Teile des humanen IgGs. Damit erwies sich diese Methode als geeignet, Autoantikörper gegen CD28 nachzuweisen. Die Blots wurden von drei unabhängigen Mitarbeitern als positiv oder negativ bewertet und ausgezählt.

In einem zweiten Schritt wurde die Beziehung der Autoantikörper gegen CD28 zu Parametern wie Alter und Geschlecht mittels *Wilcoxon rank sum test* bzw. *Fisher's exact test* untersucht. Die Auswertung ließ keine wesentliche Assoziation zu den genannten Parametern erkennen. Mittels des *Fisher's exact test* konnte eine Assoziation bezüglich unterschiedlicher Hauterkrankungen errechnet werden. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation der Autoantikörper gegen CD28 zu Erkrankungen des atopischen Formenkreises sowie autoimmuner Erkrankungen, was durch eine logistische Regressionsanalyse bestätigt werden konnte. IgE schied als korrelierender Faktor ebenfalls aus.

Im letzten Abschnitt war es von Interesse, eine immunologische Relevanz der Anti-CD28-Autoantikörper nachzuweisen. Dies gelang in einer gemischten lymphozytären Reaktion in einem bereits wohl etablierten Modell der Anergie, mittels CTLA-4-Ig. Den bestrahlten Lymphozyten in Kultur wurden Poolseren zugefügt, die CD28-Autoantikörper-positiv bzw. -negativ waren. Hierdurch war es möglich, eine stimulierende Funktion der Autoantikörper gegen CD28 zu demonstrieren, die in einer MLR nicht nur die Lymphozytenproliferation anregte, sondern auch in der Lage war, eine Lymphozytenproliferation in einem Modell der Anergie zu induzieren und den anergen Zustand damit zu überwinden.

Die mithilfe der Western-Blotting-Methode nachgewiesenen Autoantikörper gegen CD28 scheinen in deutlicher Korrelation zu atopischen und autoimmunen Erkrankungen zu stehen und immunologisch relevant zu sein. Die CD28-Autoantikörper könnten in Zukunft eine Bedeutung in Früherkennungstests für atopische oder autoimmune Erkrankungen erlangen und einen möglichen Baustein für therapeutische Möglichkeiten darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 
- <sup>1</sup> Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, Immunologie, Verlag Hans Huber, 2.Auflage,1996
- <sup>2</sup> Osman C, Swaak AJ, Lymphocytotoxic antibodies in SLE: a review of the literature, Clin Rheumatol 1994; 13:21-7
- <sup>3</sup> Swaak AJG, Lymphocytotoxic antibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier Science 1996: 478
- <sup>4</sup> Winfield JB, Mimura T, Pathogenic significance of Anti-lymphocyte Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus, Clin Immunol Immunopathol 1992; 63:13-16
- <sup>5</sup> Winfield JB, Winchester RJ, Kunkel HG, Association of cold-reactive antilymphocyte antibodies with lymphopenia in Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis Rheumatol 1975; 18:587-594
- <sup>6</sup> Morimoto C, Steinberg AD, Letvin NL, Hagan M, Takeuchi T, Daley J, Levine H, Schlossman SF, A defect of immunoregulatory T cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus patients demonstrated with Anti-2H4 antibody, J Clin Invest 1987; 79:762-768
- <sup>7</sup> Tanaka S, Matsuyama T, Steinberg AD, Schlossman SF, Morimoto C, Antilymphocyte Antibodies against CD4+2H4+ Cell populations in patients with Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis Rheumatol 1989; 32:398-405
- <sup>8</sup> Sakane T, Steinberg AD, Reeves JP, Greene I, Studies of immune function of patients with Systemic Lupus Erythematosus, J Clin Invest 1979; 64:1260-1269
- <sup>9</sup> Takeuchi T, Abe T, Kiyotaki M, Toguchi T, Koide J, Morimoto C, Homma M, In vitro Immune response of SLE lymphocytes, Scand J Immunol 1982; 16:369-377
- <sup>10</sup> Wernet P, Kunkel HG, Antibodies to a specific surface antigen of T cells in human sera inhibiting mixed leukocyte culture reactions, J Exp Med 1973; 138:1021-1026

- 
- <sup>11</sup> Mimura T, Fernsten P, Jarjour W, Winfield JB, Autoantibodies specific for different isoforms of CD45 in systemic lupus erythematosus, *J Exp Med* 1990; 172:653-656
- <sup>12</sup> Czyzyk J, Fernsten P, Shaw M, Winfield JB, Cell-type specificity of anti-CD45 autoantibodies in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum* 1996; 39:592-599
- <sup>13</sup> Revillard JP, Vincent C, Rivera S, Anti-beta2-microglobulin lymphocytotoxic autoantibodies in systemic lupus erythematosus, *J Immunol* 1979; 122:614-618
- <sup>14</sup> Propper DL, Leheny WA, Urbaniak SJ, Catto GR, Macleod AM, Lymphocytotoxins in sera from highly sensitized multiparous dialysis patients: antibody class, relationship with the, HLA and with paternal antigens, *Clin Sci (Lond)* 1991; 80:87-93
- <sup>15</sup> Khatlani TS, Ma Z, Okuda M, Inokuma H, Onischi T, Autoantibodies against T-Cell costimulatory molecules are produced in canine Autoimmune Diseases, *J Immunotherapy* 2003, 26:12-20
- <sup>16</sup> Löffler G, Petrides PE, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 5.Auflage, 1997
- <sup>17</sup> Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM, *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme, 10.Auflage, 2001
- <sup>18</sup> Dokmeci E, Herrick CA, The Immune System and Atopic Dermatitis, *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27:138-143
- <sup>19</sup> Chen YQ, Shi HZ, CD28/CTLA-4- CD80/CD86 and ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma, *Allergy* 2006; 61:15-26
- <sup>20</sup> Bour-Jordan H, Bluestone JA, CD28 Function: A Balance of Costimulatory and Regulatory Signals, *J Clin Immunol* 2002 Jan; 22(1):1-7
- <sup>21</sup> Chambers CA, Allison JP, Co-stimulation in T cell responses, *Curr Opin Immunol* 1997; 9:396-404

---

<sup>22</sup> Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK, CD28/B7 costimulation: a review, *Crit Rev Immunol* 1998; 18:389-418

<sup>23</sup> Wang S, Chen L, Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses, *Microbes and Infection* 2004; 6:759-766

<sup>24</sup> Chen L, Co-Inhibitory Molecules of The B7-CD28 Family In The Control Of T-Cell Immunity, *Nat Rev Immunol* 2004; 4:336-347

<sup>25</sup> Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA, CD28/B7 system of T cell Costimulation, *Annu Rev Immunol* 1996; 14:233-258

<sup>26</sup> Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB, T-cell regulation by CD28 and CTLA-4, *Nat Rev Immunol* 2001; 1:220-228

<sup>27</sup> Croft M, Bradley LM, Swain SL, Naïve versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells, *J Immunol* 1994; 152:2675-2685

<sup>28</sup> Zhan Y, Corbett AJ, Brady JL, Sutherland RM, Lew AM, CD4 help-independent induction of cytotoxic CD8 cells to allogenic P815 tumor cells is absolutely dependent on Costimulation, *J Immunol* 2000; 165:3612-3619

<sup>29</sup> Gaglia JL, Greenfield EA, Mattoo A, Sharpe AH, Freeman GJ, Kuchroo VK, Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient T cells, *J Immunol* 2000; 165:6091-6098

<sup>30</sup> McAdam AJ, Gewurz BE, Farkash EA, Sharpe AH, Either B7 costimulation or IL-2 can elicit generation of primary alloreactive CTL, *J Immunol* 2000; 165:3088-3093

<sup>31</sup> Makrigiannis AP, Musgrave BI, Haeryfar SM, Hoskin DW, Interleukin-12 can replace CD28-dependent T-cell costimulation during non-specific cytotoxic T lymphocyte induction by anti-CD3 antibody, *J Leukoc Biol* 2001; 69:113-122

---

<sup>32</sup> Teh HS, Teh SJ, High concentrations of antigenic ligand activate and do not tolerize naïve CD4 T cells in the absence of CD28/B7 costimulation, *Cell Immunol* 1997; 179:74-83

<sup>33</sup> Green JM, Noel PJ, Sperling AI, Walunas TL, Gray GS, Bluestone JA, Thompson CB, Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice, *Immunity* 1994; 1:501-508

<sup>34</sup> Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kuding TM, Kiahihara K, Wakaham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW, Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice, *Science* 1993; 261:609-612

<sup>35</sup> Newell KA, He G, Guo Z, Kim O, Szot GI, Rulifson I, Zhou P, Hart J, Thistlethwaite JR, Bluestone JA, Cutting edge: Blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells, *J Immunol* 1999; 163:2358-2362

<sup>36</sup> Acuto O, Michel F, CD28-mediated Co-Stimulation: A Quantitative support for TCR signalling, *Nat Rev Immunol* 2003; 3:939-951

<sup>37</sup> June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB, The B7 and CD28 receptor families, *Immunol Today* 1994; 15:321-331

<sup>38</sup> Carreno BM, Collins M, The B7 family of ligands and its receptors new pathways for Costimulation and inhibition of immune response, *Annu Rev Immunol* 2002; 20:29-53

<sup>39</sup> Martin PJ, Ledbetter JA, Morishita Y, June CH, Beatty PG, Hansen JA, A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates Interleukin-2 production by activated human lymphocytes, *J Immunol* 1986; 136:3282-3287

<sup>40</sup> Aruffo A und Seed B, Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system, *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:8573-8577

<sup>41</sup> Schwartz JC, Zhang X, Fedorov AA, Nathenson SG, Almo SC, Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex, *Nature* 2001; 410:604-608

- 
- <sup>42</sup> Damle NK, Linsley PS, Ledbetter JA, Direct helper T cell- induced B cell differentiation involves interaction between T cell antigen CD28 and B cell activated antigen B7, *Eur J Immunol* 1991; 21:1277-1282
- <sup>43</sup> Augustin M, Dietrich A, Niedner R, Kapp A, Schöpf E, Bradey W, Ledbetter JA, Linsley PS, Simon JC, Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-treated human keratinocytes express B7- linke molecules that serve a costimulatory role in T-cell activation, *J Invest Dermatol* 1993; 100:275-281
- <sup>44</sup> Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, Davis SJ, The interaction properties of costimulatory molecules revisited, *Immunity* 2002; 17:201-210
- <sup>45</sup> Sperling AI, Linsley PS, Barrett TA, Bluestone JA, CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor-  $\gamma/\delta$ + T lymphocytes, *J Immunol* 1993; 151:6943-6050
- <sup>46</sup> Viola A, Lanzaveccia AT, T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds, *Science* 1996; 273:104-106
- <sup>47</sup> Boise L, Minn A, Noel P, Thompson C, CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xl, *Immunity* 1995; 3:87-98
- <sup>48</sup> Sperling AI, Auger JA, Ehst BD, Rulifson IC, Thompson CB, Bluestone JA, CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation, *J Immunol* 1996; 157:3909-3917
- <sup>49</sup> Lucas PJ, Negishi I, Nakayama K, Fields LE, Loh DY, Naïve CD28-deficient cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response, *J Immunol* 1995; 154:5757-5768
- <sup>50</sup> Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM, B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals,

---

since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4, *Immunity* 1995; 2:523-532

<sup>51</sup> Cerdan C, Martin Y, Courcoul M, Brailly H, Mawas C, Birg F, Olive D, Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation, *J Immunol* 1992; 149:2255-2261

<sup>52</sup> June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T und Thompson CB, T-cell Proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant Interleukin 2 gene expression, *Mol Cel Biol* 1987; 7:4472-4481

<sup>53</sup> Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A, Regulation of Interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28, *Science* 1991; 251:313-316

<sup>54</sup> Linsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB, Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway, *Science* 1989; 244:229-343

<sup>55</sup> Stein PH, Fraser JD, Weiss A, The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with Phosphatidylinositol 3-Kinase, *Mol Cel Biol* 1994; 14:3392-3402

<sup>56</sup> De Boer M, Kasran A, Kwekkeboom J, Walter H, Vandenberghe P, Ceuppens JL, Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells, *Eur J Immunol* 1993; 23:3120-3125

<sup>57</sup> Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA, CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines, *J Immunol* 1997; 158:658-665

<sup>58</sup> Lorre K, Kasran A, Van Vaeck F, de Boer M, Ceuppens JM, Interleukin-1 and B7/CD28 interaction regulate interleukin-6 production by human T cells, *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70:81-90

- 
- <sup>59</sup> Minty A, Chalou P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liazun P, Miloux B, et al., Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses, *Nature* 1992; 18:248-250
- <sup>60</sup> Shanafelt MC, Soderberg C, Allsup A, Adelman D, Peltz G, Lahesmaa R, Costimulatory signals can selectively modulate cytokine production by subsets of CD4+ cells, *J Immunol* 1995; 154:1684-1690
- <sup>61</sup> Cerdan C, Razanajaona D, Martin Y, Courcoul M, Pavon C, Mawas C, Olive D, Birg F, Contributions of the CD2 and CD28 T lymphocyte activation pathways to the regulation of the expression of the colony-stimulating factor (CSF-1) gene, *J Immunol* 1992; 15:373-379
- <sup>62</sup> Thompson CB, Linsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH, CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines, *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1333-1337
- <sup>63</sup> Herold KC, Lu J, Rulifson I, Vezys V, Taub D, Grusby MJ, Bluestone JA, Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation, *J Immunol* 1997; 159:4150-4153
- <sup>64</sup> Horuk R, Ng HP, The discovery and therapeutic applications of CCR 1 chemokine receptor antagonists, *IDrugs* 1999; 2:418-425
- <sup>65</sup> Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P, Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective, *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11:35-42
- <sup>66</sup> Terpos E, Politou M, Viniou N, Rahemtulla A, Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) in multiple myeloma, *Leuk Lymphoma* 2005; 46:1699-1707
- <sup>67</sup> Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Brocker T, Lane PJ, Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX 40, *Immunol today* 2000; 21:333-337
- <sup>68</sup> Sharpe AH, Freeman GJ, The B7-CD28 superfamily, *Nature Rev* 2002; 2:116-126

---

<sup>69</sup> Polymenis M, Schmidt EV, Coordination of cell growth with cell division, *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:76-80

<sup>70</sup> Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree GR, Brown PO, Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:11796-11801

<sup>71</sup> Kane LP, Lin J, Weiss A, It's all Rel-ative: NF-kappa B and CD28 costimulation of T-cell activation, *Trends Immunol* 2002; 23:413-420

<sup>72</sup> Rao S, Gerondakis S, Woltring D, Shannon MF, c-Rel is required for chromatin remodelling across the IL-2 gene promoter, *J Immunol* 2003; 170:3724-3731

<sup>73</sup> Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A, Crabtree GR, Rapid and phosphatidylinositol- dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signalling, *Cell* 1998; 95:625-636

<sup>74</sup> Bruniquel D, Schwartz RH, Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process, *Nat Immunol* 2003; 4:235-240

<sup>75</sup> Michel F, Mangino G, Attal-Bonnefoy G, Tousto L, Alcover A, Roumier A, Olive D, Acuto O, CD28 utilizes Vav-1 to enhance TCR-proximal signalling and NF-AT activation, *J Immunol* 2000; 165:3820-3829

<sup>76</sup> Ricon M, Flavell RA, AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes, *EMBO J* 1994; 13:4370-4381

<sup>77</sup> Barz C, Nagel T, Truitt KE, Imboden JB, Mutational analysis of CD28 mediated Costimulation of Jun-N-Terminal Kinase and IL-2-Production, *J Immunol* 1998; 161:5366-5372

<sup>78</sup> Sears RC, Nevins JR, Signaling networks that link cell proliferation and cell fate, *J Biol Chem* 2002; 277:11617-11620

---

<sup>79</sup> Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y, JNK is involved in signal integration during costimulation of T Lymphocytes, *Cell* 1994; 77:727-736

<sup>80</sup> Burr JS, Savage NDL, Messah GE, Kimzey SL, Shaw AS, Arch RH, Green JM, Cutting Edge: Distinct Motifs Within CD28 Regulate T Cell Proliferation and Induction of Bcl-xL, *J Immunol* 2001; 166:5331-5335

<sup>81</sup> Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma, *Springer Semin Immunopathol* 2004; 25:349-359

<sup>82</sup> Ferguson SE, Han S, Kelsoe G, Thompson CB, CD28 is required for germinal center formation, *J Immunol* 1996; 156:4576-4581

<sup>83</sup> Prilliman KR, Lemmens EE, Palioungas G, Wolfe TG, Allison JP, Sharpe AH, Schoeneberger SP, Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL, *J Immunol* 2002; 169:4094-4097

<sup>84</sup> Fraser JD, Straus D, Weiss A, Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression, *Immunol Today* 1993; 14:357-362

<sup>85</sup> Toyooka K, Maruo S, Iwahori T, Yamamoto N, Tai X, Abe R, Takahama Y, Murakami M, Uede T, Hamaoka T, Fuyiwara H, CD28 co-stimulatory signals induce IL-2 receptor expression an antigen-stimulated virgin T cells by an IL-2-independent mechanism, *Int Immun* 1996; 8:159-169

<sup>86</sup> Appleman LJ, Boussiotis VA, T cell anergy and Costimulation, *Immunol Rev* 2003; 192:161-180

<sup>87</sup> Imboden JB, Strobo JD, Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions intracellular stores, *J Exp Med* 1985; 161:446-456

---

<sup>88</sup> Prasad KV, Cai YC, Raab M, Duckworth B, Cantley L, Showlson SE, Rudd CE, T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:2834-2838

<sup>89</sup> August A, Dupont B, CD28 of T lymphocytes associates with phosphatidylinositol 3-kinase, *Int Immunol* 1994; 6:769-774

<sup>90</sup> Pages F, Ragueneau M, Klasen S, Battifora M, Couez D, Sweet R, Truneh A, Ward SG, Olive D, Two distinct intracytoplasmic regions of the T-cell adhesion molecule CD28 participate in phosphatidylinositol 3-kinase association, *J Biol Chem* 1996; 271:9403-9409

<sup>91</sup> Chuang E, Fisher TS, Morgan RW, Robbins MD, Duerr JM, Van der Heiden MG, Gardner JP, Hambor JE, Neveu MJ, Thompson CB, The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the Serine/Threonine Phosphatase PP2A, *Immunity* 2000; 13:313-322

<sup>92</sup> Okkenhaug K, Bilancio A, Emery JL, Vanhaesebroeck B, Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival, *Biochem Soc Trans* 2004; 32:332-335

<sup>93</sup> Kapeller R, Cantley LC, Phosphatidylinositol 3-kinase, *Bio Essays* 1994; 16:565-576

<sup>94</sup> Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Garder P, Crabtree GR, Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3, *Science* 1997; 275:1930-1934

<sup>95</sup> Coudronniere N, Villalba M, Englund N, Altman A, NF- $\kappa$ B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C- $\theta$ , *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3394-3399

<sup>96</sup> Takesono A, Finkelstein LD, Schwartzberg PL, Beyond calcium: new signalling pathways for Tec family kinases, *J Cell Sci* 2002; 115:3039-3048

<sup>97</sup> Sears RC, Nevins JR, Signalling networks that link cell proliferation and cell fate, *J Biol Chem* 2002; 277:11617-11620

---

<sup>98</sup> Kane LP, Andres PG, Howland KC, Abbas AK, Weiss A, Akt provides the CD28 co-stimulatory signal for up regulation of IL-2 and IFN- $\gamma$  but not Th2-cytokines, *Nature Immunol* 2001; 2:37-44

<sup>99</sup> Marinari B, Constanzo A, Viola A, Michel F, Mangino G, Acuto O, Levrero M, Piccolella E, Tuosto L, Vav cooperates with CD28 to induce NF-kappa B activation via a pathway involving Rac-1 and mitogen-activated kinase kinase 1, *Eur J Immunol* 2002; 32:447-456

<sup>100</sup> Hehner SP, Hofmann TG, Dienz O, Droge W, Schmitz ML, Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell receptor- and CD28-mediated activation of JNK, p38 and interleukin-2 transkription, *J Biol Chem* 2000; 275:18160-181171

<sup>101</sup> Chen L, Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion, *Immunol today* 1998; 19:27-30

<sup>102</sup> Cibotti R, Punt JA, Dash KS, Sharrow SO Singer A, Surface molecules that drive T cell development in vitro in the absence of thymic epithelium and in the absence of lineage-specific signals, *Immunity* 1997; 6:245-255

<sup>103</sup> McAdam AJ, Grenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH, ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching, *Nature* 2001; 409:102-105

<sup>104</sup> Walunas TL, Sperling AI, Khattri R, Thompson CB, Bluestone JA, CD28 expression is not essential for positive and negative selection of thymocytes or peripheral T cell tolerance, *J Immunol* 1996; 156:1006-1013

<sup>105</sup> Chambers CA, Cado D, Truong T, Allison JP, Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9296-9301

<sup>106</sup> Keir ME, Sharpe AH, The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity, *Immunol Rev* 2005; 204:128-143

- 
- <sup>107</sup> Gross JA, Callas E, Allison JP, Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse, *J Immunol* 1992; 149:380-388
- <sup>108</sup> Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ, Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide, *Nat Immunol* 2001; 2:301-306
- <sup>109</sup> Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA, B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes, *Immunity* 2000; 2:301-306
- <sup>110</sup> Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA, Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells, *J Immunol* 2003; 171: 3348- 3352
- <sup>111</sup> Sansom DM, Walker LS, The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) in regulatory T cell biology, *Immunol Rev* 2006; 212:131-148
- <sup>112</sup> Jones G, Wu S, Jang N, Fulcher D, Hogan P, Steward G, Polymorphisms within the CTLA-4 gene are associated with infant atopic dermatitis, *Br J Dermatol* 2006; 154:467-471
- <sup>113</sup> Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM, Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 15:6586-6590
- <sup>114</sup> Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP, CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones, *Nature* 1992, 356:607-609
- <sup>115</sup> Jenkins MK, Ashwell JD, Schwartz RH, Allogeneic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigen and chemically modified antigen-presenting cells, *J Immunol* 1988; 15:3324-3330

- 
- <sup>116</sup> Tan R, Teh SJ, Ledbetter JA, Linsley PS, Teh HS, B7 costimulates proliferation of CD4-8+ T lymphocytes but is not required for the deletion of immature CD4+8+ thymocytes, *J Immunol* 1992; 149:3217-3224
- <sup>117</sup> Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Damle NK, Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes, *J Exp Med* 1992; 176: 1595-1604
- <sup>118</sup> Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA, CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7, *J Exp Med* 1991; 174:561-569
- <sup>119</sup> Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E, Barber, Restivo VA, Ke X, Gray GS, Nadler LM, CTLA-4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:811-815
- <sup>120</sup> Pagès F, Ragueneau M, Rottapel R, Truneh A, Nunes J, Imbert J, Olive D, Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling, *Nature* 1994; 369:327-329
- <sup>121</sup> Fraser JH, Rincón M, McCoy KD, Gros GL, CTLA-4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF $\kappa$ B activity in activated T cells, *Eur J Immunol* 1999; 29:838-844
- <sup>122</sup> Linsley PS, Nadler SG, Bajorath J, Peach R, Leung HT, Rogers J, Bradshaw J, Stebbins M, Leytze G, Brady W, Malacko AR, Marquardt H, Shaws SY, Binding stoichiometry of the Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Molecule-4 (CTLA-4), *J Biol Chem* 1995; 270:15417-15424
- <sup>123</sup> Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, Simonetti J, Mamoni P, Maras C, Olive D, Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34, *Immunogenetics* 1990; 31:198-301
- <sup>124</sup> Oosterwegel, MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschach RB, Sharpe AH, CTLA-4 and T cell activation, *Curr Opin Immunol* 1999; 11:294-300

- 
- <sup>125</sup> Sotomayor EM, Borrelío I, Tubb E, Allison JP, Levitsky HI, In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 163:11476-11481
- <sup>126</sup> Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA, Binding of the B Cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T Cell proliferation and Interleukin- 2 mRNA accumulation, *J Exp Med* 1991; 173:721-730
- <sup>127</sup> Freeman GJ, Lombard DB, Gimmi CD, Brod SA, Lee K, Laning JC, Hafler CA, Dorf ME, Gray GS, Reiser H, June CH, Thompson CB, Nadler LM, CTLA- 4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation, *J Immunol* 1992; 149:3795-3801
- <sup>128</sup> Perez VL, van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Storm TB, Abbas AK, Induction of peripheral T Cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement, *Immunity* 1997; 6:411-417
- <sup>129</sup> Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA, CTLA-4 Ligation blocks CD28-dependent T cell activation, *J Exp Med* 1996; 183:2541-2550
- <sup>130</sup> Krummel MF, Allison JP, CTLA-4 engagement Inhibits IL-2 Accumulation and Cell Cycle Progression upon Activation of Resting T Cells, *J Exp Med* 1996; 183:2533-2540
- <sup>131</sup> Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM, Maintenance of Human T Cell anergy: Blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap 1, *Science* 1997; 278:124-127
- <sup>132</sup> Greenwald RJ, Boussiotis VA, Lorschach RB, Abbas AK, Sharpe AH, CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo, *Immunity* 2001; 14:145-155
- <sup>133</sup> Lühder F, Höglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D, Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of Autoimmune Diabetes, *J Exp Med* 1998; 187:427-432
- <sup>134</sup> Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA, CTLA-4: a negative regulator of Autoimmune Disease, *J Exp Med* 1996; 184:783-788

- 
- <sup>135</sup> Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, June CH, Racke MK, CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis, *J Immunol* 1996; 157:1333-1336
- <sup>136</sup> Leach DR, Krummel MF, Allison JP, Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade, *Science* 1996; 271:1734-1736
- <sup>137</sup> Mathur M, Herrmann K, Qin Y, Gulmen F, Li X, Krimins R, Weinstock J, Elliott D, Bluestone JA, Padrid P, CD28 interactions with either CD80 or CD86 are sufficient to induce Allergic Airway Inflammation in mice, *Am Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:498-509
- <sup>138</sup> Larché M, Till SJ, Halseden BM, North J, Barkans J, Corrigan CJ, Kay AB, Robinson DS, Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics, *J Immunol* 1998, 161:6375-6382
- <sup>139</sup> Leung DYM, Role of IgE in atopic dermatitis, *Curr Opin Immunol* 1993; 5:956-962
- <sup>140</sup> Gascan H, Gauchat J-F, Aversa G, Vlasselaer PV, De Vries JE, Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signalling pathways, *J Immunol* 1991; 147:8-13
- <sup>141</sup> Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D, CD40 and IgE: Synergism between anti- CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells, *J Exp Med* 1990; 172:1861-1864
- <sup>142</sup> Rousset F, Garcia E, Banchereau J, Cytokine- induced proliferation and immunoglobulin production of human lymphocytes triggered through their CD40 antigen, *J Exp Med* 1991; 173:705-710
- <sup>143</sup> Vercelli D, Jabara HH, Arai K-I, Geha RS, Induction of human IgE-synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens, *J Exp Med* 1989; 169:1295-1307

- 
- <sup>144</sup> Bonnefoy JY, Aubry JP, Gauchat JF, Graber P, Life P, Flores-Romo L, Mazzei G, Receptors for IgE, *Curr Opin Immunol* 1993; 5:944-949
- <sup>145</sup> Mc Geady SJ, Buckley RH, Depression of cell- mediated immunity in atopic eczema, *J Allergy* 1975; 56:393-406
- <sup>146</sup> Neuber K, Hilger A, König W, Interleukin-3, interleukin-4, FMLP and C5a enhance the release of leukotriens from neutrophils of patients with atopic dermatitis, *Immunology* 1991; 73:83-87
- <sup>147</sup> Avgerinou G, Goules AV, Stavropoulos PG, Katsambas AD, Atopic dermatitis: new immunological aspects, *Int J Dermatol* 2008; 47:219-224
- <sup>148</sup> Hanifin JM, Raika G, Diagnostic features of atopic dermatitis, *Acta Derm Ven, Stockh Suppl.* 1980; 92:44-47
- <sup>149</sup> Rothe MJ, Grant-Kels M, Atopic dermatitis: an update, *J Am Acad Derm* 1996; 35:1-3
- <sup>150</sup> Amon EU, Immunopathologie der atopischen Dermatitis, *Dtsch Med Wschr* 1991; 116:102-107
- <sup>151</sup> Bieber T, Atopic Dermatitis, *New Engl J Med* 2008; 358:1483-1494
- <sup>152</sup> Mihm MC, Nicholas MD, Soter A, Dvorak HF, Austen KF, The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema, *J Invest Dermatol* 1976; 67:305-312
- <sup>153</sup> Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J, A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis, *Immunol Today* 1998; 19:359-361
- <sup>154</sup> Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Interleukin-31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice, *Nat Immunol* 2004; 5:752-760

- 
- <sup>155</sup> Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T, Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema, *J Invest Dermatol* 1996; 106:446-453
- <sup>156</sup> Wollenberg A, Wen S, Bieber T, Langerhans cell phenotyping: A new tool for differential diagnosis of inflammatory skin diseases, *Lancet* 1995; 346:1626-1627
- <sup>157</sup> Schuller E, Teichmann B, Haberstock J, Moderer M, Bieber T, Wollenberg A, In situ-expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 on Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) in atopic dermatitis, *Arch Dermatol* 2001; 293:448-454
- <sup>158</sup> Grewe M, Walther S, Gyufko K, Czech W, Schöpf E, Krutmann J, Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients, *J Invest Dermatol* 1995; 105:407-410
- <sup>159</sup> Taha RA, Leung DY, Ghaffar O, Boguniewicz M, Hamid Q, In vivo expression of cytokine receptor mRNA in atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:245-250
- <sup>160</sup> Stone SP, Muller SA, Gleich GJ, IgE levels in atopic dermatitis, *Arch Dermatol* 1973; 108:806-811
- <sup>161</sup> Mothes N, Niggemann B, Jenneck C, Hagemann T, Weidinger S, Bieber T, Valenta R, Novak N, The cradle of IgE autoreactivity in atopic eczema lies in early infancy, *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:706-709
- <sup>162</sup> Aktas E, Akdis M, Bilgic S, Disch R, Falk CS, Blaser K, Akdis C, Deniz G, Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells, *Clin Exp Immunol* 2005; 140:301-309
- <sup>163</sup> Katsuta M, Takigawa Y, Kimishima M, Inaoka M, Takahashi R, Shiohara T, NK cells and gamma delta+ T cells are phenotypically and functionally defective due to preferential apoptosis in patients with atopic dermatitis, *J Immunol* 2006; 176:7736-7744

- 
- <sup>164</sup> Toda M, Leung DY, Molet S, Boguniewicz M, Taha R, Christodoulopoulos P, Fukuda T, Elias JA, Hamid QA, Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions, *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:875-881
- <sup>165</sup> De Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA, Atopic Dermatitis: A Disease Caused by Innate Immune Defects?, *J Invest Dermatol* 2009; 129:14-30
- <sup>166</sup> Trinchieri G, Sher A, Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence, *Nat Rev Immunol* 2007; 7:179-190
- <sup>167</sup> McGirth LY, Beck LA, Innate immune defects in atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:202-208
- <sup>168</sup> Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE, IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages, *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821-852
- <sup>169</sup> Braff MH, Gallo RL, Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier, *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 306:91-110
- <sup>170</sup> Chisholm D, Libet L, Hayashi T, Horner AA, Airway peptidoglycan and immunostimulatory DNA exposures have divergent effects on the development of airway allergen hypersensitivities, *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:448-454
- <sup>171</sup> Eisenbarth SC, Cassel S, Bottomly K, Understanding asthma pathogenesis: linking innate and adaptive immunity, *Curr Opin Pediatr* 2004; 16:659-666
- <sup>172</sup> Ogg G, Role of T cells in the pathogenesis of atopic dermatitis, *Clin Exp Allergy* 2008; 39:310-316
- <sup>173</sup> Abeck D, Mempel M, Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and in therapeutic implications, *Br J Dermatol* 1998; 139 Suppl 53:13-6
- <sup>174</sup> Neuber K, Steinrücke K, Ring J, Staphylococcal enterotoxin B affects in vitro IgE Synthesis, interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-5 production in atopic eczema, *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:179-182

- 
- <sup>175</sup> Baker BS, The role of microorganisms in atopic dermatitis, *Clin Exp Immunol* 2006; 144:1-9
- <sup>176</sup> Brown SJ, Irvine AD, Atopic Eczema and the Filaggrin Story, *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27:128-137
- <sup>177</sup> Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et.al, Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, *Nat Genet* 2006; 38:441-446
- <sup>178</sup> Arikawa J, Ishibashi M, Kawashima M, Takagi Y, Ichikawa Y, Imokawa G, Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*, *J Invest Dermatol* 2002; 119:443-439
- <sup>179</sup> Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?, *J Invest Dermatol* 1991; 96:523-526
- <sup>180</sup> Kay AB, Allergy and allergic diseases. First of two parts, *New Engl J Med* 2001; 344:30-37
- <sup>181</sup> Tattersfield E, Knox AJ, Britton JR, Hall IP, Asthma, *Lancet* 2002; 360:1313-1322
- <sup>182</sup> Mazarella G, Bianco A, Catena E, De Palma R, Abbate GF, Th1/Th2 lymphocytes polarization in asthma, *Allergy* 2000; 61:6-9
- <sup>183</sup> Schweitzer AN, Sharpe AH, The complexity of the B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathway, *Agents Actions Suppl* 1998; 49:33-43
- <sup>184</sup> Fölster-Holst R, Pape M, Buss YL, Christophers E, Weichenthal M, Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients, *Allergy* 2006; 61:629-632
- <sup>185</sup> Neuber K, Schmidt S, Mensch A, Telomere length measurement and determination of immunosenescence-related markers (CD28, CD45RO, CD45RA, IFN-g and IL-4) in skin-

---

homing T cells expression the cutaneous Lymphocyte antigen: indication of a non-ageing T cell subset, *Immunology* 2003; 109:24-31

<sup>186</sup> Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM, Bos JD, van Lier RAW, Kapsenberg ML, Human atopen-specific types 1 and 2 helper cell clones, *J Immunol* 1991; 147:2942-2949

<sup>187</sup> Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bandley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB, Predominant Th2-like bronchioalveolar T-lymphocyte population in atopic Asthma, *New Engl J Med* 1992; 326:298-304

<sup>188</sup> Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY, Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis, *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:323-331

<sup>189</sup> Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3730-3734

<sup>190</sup> Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE, CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production, *J Exp Med* 1994; 179:299-304

<sup>191</sup> Macphee IA, Turner DR, Yagitat H, Oliveira BG, The Th2-response in mercuric chloride-induced autoimmunity requires continuing costimulation via CD28, *Clin Exp Immunol* 2002; 129:405-410

<sup>192</sup> Chapoval SP, David CS, CD28 costimulation is critical for experimental allergic asthma in HLA-DQ8 transgenic mice, *Clin Immunol* 2003; 160:83-94

<sup>193</sup> Oberwalleney G, Henz BM, Worm M, Expression and functional role of co-stimulatory molecules in CD40+IL-4-stimulated B cells from atopic and non-atopic donors, *Acta Derm Venerol* 2000; 80:287-291

- 
- <sup>194</sup> Mathur M, Hermann K, Qin Y, Gulmen F, Li X, Krimins R, Weinstock J, Elliott D, Bluestone JA, Padrid P, CD28 interactions with either CD80 or CD86 are sufficient to induce allergic airway inflammation in mice, *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:498-509
- <sup>195</sup> Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM, Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis, *J Immunol* 1994; 153:4142-4148
- <sup>196</sup> Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, Coyle AJ, Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell (Th2) immune response and altered airway responsiveness, *J Exp Med* 1997; 185:1671-1679
- <sup>197</sup> Howard TD, Postma DS, Hawkins GA, Koppelman GH, Zheng SL, Wysong AK, Xu J, Meyers DA, Bleeker ER, Fine mapping of an IgE-controlling gene on chromosome 2q: analysis of CTLA-4 and CD28, *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:743-751
- <sup>198</sup> Akdis CA, Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding, *FASEB J* 2000; 14:1666-1668
- <sup>199</sup> Bruynzeel-Koomen CA, VanWichen DF, Spry CJ, Venge P, Bruynzeel PL, Active participation of eosinophils in patch-test reactions to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis, *Brit J Dermat* 1988; 118:229-238
- <sup>200</sup> Clark RA, Adinoff AD, Aeroallergen contact can exacerbate atopic dermatitis. Patch test as a diagnostic tool, *J Amer Acad Derm* 1989; 21:863-869
- <sup>201</sup> Mitchell EB, Crow J, Chapman MD, Sukminder SJ, Pope FM, Platts-Mills TA, Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis, *Lancet* 1982; 1:127-130
- <sup>202</sup> Mitchell EB, Crow J, Williams G, Platts-Mills TA, Increase in skin mast cells following chronic house dust mite exposure, *Brit J Derm* 1986; 114:65-73

- 
- <sup>203</sup> Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO, Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases, *Immunol Today* 1995; 16:34-38
- <sup>204</sup> Finck BK, Linsley PS, Wofsy D, Treatment of murine lupus with CTLA-4-Ig, *Science* 1994; 265:1225-1227
- <sup>205</sup> Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, De Gruyter Verlag, 260. Auflage, 2004
- <sup>206</sup> Alvarado C, Alcocer-Varela J, Llorente L, Richaud Patin Y, Cerbon M, Alarcon-Segovia D, Effect of CD28 antibody on T cells from patients with systemic lupus erythematosus, *J Autoimmunol* 1994; 7:763-773
- <sup>207</sup> Sfrikakis PP, Zografou A, Viglis V, Iniotaki-Theodoraki A, Piskontaki I, Tsokos GC, Sfrikakis P, Choremi-Papadopoulou H, CD28 expression on T cell subsets in vivo and CD28-mediated T cell response in vitro in patients with Rheumatoid Arthritis, *Arthritis Rheumatol* 1995; 38:649-654
- <sup>208</sup> Salomon B, Bluestone JA, Complexities of CD28-B7: CTLA-4 Costimulatory Pathways in Autoimmunity and Transplantation, *Annu Rev Immunol* 2001; 19:225-252
- <sup>209</sup> Bour-Jourdan H, Salomon BL, Thompson HL, Szot GL, Bernhard MR, Bluestone JA, Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells, *J Clin Invest* 2004; 114:979-987
- <sup>210</sup> Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Khoury SJ, Regulatory functions of CD8+ CD28- T cells in an autoimmune disease model, *J Clin Invest* 2003; 112:1037-1048
- <sup>211</sup> Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Haneij N, Nishino M, Azuma M, Saito I, Hayashi Y, Autoantigen-specific CD4<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cell subset prevents autoimmune exocrinopathy in murine Sjögren's Syndrome, *J Immunol* 2000; 165:2251-2257
- <sup>212</sup> Chapoval SP, David CS, CD28 costimulation is critical for experimental allergic asthma in HLA-DQ8 transgenic mice, *Clin Immunol* 2003; 106:83-94

- 
- <sup>213</sup> Van Nerveen RJ, Van de Pol MM, Van der Zee JS, Stiekema FE, De Boer M, Dapsenberg ML, Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression, *Clin Exp Allergy* 1998; 28:808-816
- <sup>214</sup> Keane-Myres A, Gause WG, Linsley PS, Chen SJ, Wills-Karp M, B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens, *J Immunol* 1997; 158:2042-2049
- <sup>215</sup> Padrid PA, Mathur M, Li X, Herrmann K, Qin Y, Cattamanchi A, Weinstock J, Elliott D, Sperling AI, Bluestone JA, CTLA-4-Ig inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness by regulating the development of Th1/Th2 subsets in a murine model of asthma, *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:453-462
- <sup>216</sup> Gonzalo JA, Tian J, Delaney T, Corcoran J, Rottman JB, Lora J, Al-garawi A, Kroczeck R, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory response, *Nat Immunol* 2001; 2:597-604
- <sup>217</sup> Ip WK, Wong CK, Leung TF, Lam CW, Elevation of plasma soluble T cell costimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in children with allergic asthma, *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137:45-52
- <sup>218</sup> Wong CK, Lun CW, Ko FW, Ip WK, Hui DS, Lam CW, Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma, *Clin Exp Immunol* 2005; 141:122-129
- <sup>219</sup> Qin XJ, Shi HZ, Qin SM, Kang LF, Huang CP, Zhong XN, Effects of allergen inhalation and oral glucocorticoid on serum soluble CTLA-4 in allergic asthmatics, *Allergy* 2005; 60:774-779
- <sup>220</sup> Mittermann I, Aichberger KJ, Bänder R, Mothes N, Renz H, Valenta R, Autoimmunity and atopic dermatitis, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:367-371

---

<sup>221</sup> Ohkouchi K, Mizutani H, Tanaka M, Takahashi M, Nakashima D, Shimizu M, Anti-elongation factor 1-alpha autoantibody in adult atopic dermatitis patients, *Int Immunol* 1999; 11:1635-1640

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Neuber K, Mähns B, Hübner C, Gergely H, Weichenthal M  
Autoantibodies against CD28 are associated with atopic diseases  
Clinical and Experimental Immunology 2006; 146:262-269

---

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
DC	dendritische Zellen
Filaggrin	filament-aggregating protein
IDEC	infiltrating inflammatory dendritic epidermal cells
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
MHC	major histocompatibility complex
MLR	mixed lymphocyte reaction/ gemischt lymphozytäre Reaktion
NK	natürliche Killerzellen
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptoren
Tregs	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor

---

## 8. Danksagungen

Frau Professor Dr. I. Moll danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an der Hautklinik durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. K. Neuber für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertationsschrift und für seine Unterstützung. Er konnte mich durch seinen viel zu frühen Tod leider nicht bis zur Fertigstellung dieser Arbeit begleiten.

Professor Dr. M. Augustin möchte ich ausdrücklich für die weitere Betreuung danken. Durch seine Unterstützung und seine Anregungen konnte diese Arbeit fertig gestellt werden.

Frau B. Mähns möchte ich für die hervorragende Betreuung und kompetente Einführung in das Laborwesen danken. Ihre Ermunterung und Unterstützung waren für die Fertigstellung dieser Arbeit besonders wichtig. Dankend hervorheben möchte ich auch, dass sie die Herstellung der Poolseren und die gemischt lymphozytäre Reaktion durchführte, deren Ergebnisse wesentlich zur Aussagekraft dieser Arbeit beitrugen.

Mein Dank geht auch an Frau G. Finger für die Bereitstellung der IgE-Werte und ihre stete Bereitschaft, Fragen zu beantworten.

Dr. Guse möchte ich für die Bereitstellung der Raji- und Jurkat-Zellen danken.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Mann für die stete Aufmunterung und Hilfe bedanken.

---

## 9. Lebenslauf

**Persönliche Daten:** Hedwig Franziska Gergely  
geboren am 08.05.1979 in Darmstadt  
Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulbildung:** 1985-1989 Grundschule in Pfungstadt  
1989-1998 Lichtenbergschule, Gymnasium in Darmstadt

**Hochschule:** 1999-2005 Studium der Humanmedizin  
1999-2002 Johann- Wolfgang- Goethe- Universität in Frankfurt a.M.  
2002-2005 Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf  
2004-2005 Praktisches Jahr  
-Neurologie, Asklepios Klinik Altona, Hamburg  
-Innere Medizin, Asklepios Klinik Altona, Hamburg und  
University of Western Ontario, London, Ontario, Kanada  
-Chirurgie, Schön Kliniken Eilbek, Hamburg

**Prüfungen:** 17.04.2001 Ärztliche Vorprüfung  
11.04.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
15.09.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08.12.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Berufstätigkeit** Seit 05/2006 Assistenzärztin in Weiterbildung, Neurologische  
Abteilung, Asklepios Klinik Harburg, Hamburg

---

## 10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: