

**Beeinflussung antigenspezifischer humaner
T-Zellen durch die Blockade von
CD152 (CTLA-4)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der
Universität Hamburg

vorgelegt von
Uwe Speck
Hamburg 2002

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg auf Antrag von
Herrn Professor Dr. B. FLEISCHER

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 25. Oktober 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Aufgaben des Immunsystems	1
1.2 B- und T-Lymphozyten.....	2
1.3 Aktivierung der T-Lymphozyten.....	4
1.4 Kostimulation	4
1.4.1 Positive Kostimulation durch CD28	5
1.4.2 Weitere kostimulatorische Moleküle	5
1.5 Abschaltung der T-Zellen	7
1.6 Negative Kostimulation durch CTLA-4	7
1.6.1 Expression	9
1.6.2 Molekulare Inhibitionsmechanismen und Signaltransduktion	10
1.6.3 CTLA-4 beeinflusst den Zellzyklus, nicht den Zelltod	12
1.6.4 CTLA-4 und Toleranz.....	12
1.6.5 CTLA-4 und regulatorische T-Lymphozyten.....	13
1.6.6 CTLA-4 und die Aktivierung von T-Lymphozyten	14
1.7 Manipulation der Kostimulation.....	16
1.7.1 CTLA-4-Blockade und Tumorabwehr.....	16
1.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien.....	19
2.2 Plastik- und Glaswaren	19
2.3 Zellbiologische Arbeiten	20
2.3.1 Reagenzien	20
2.3.2 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	21
2.3.3 Zell-Linien.....	23
2.3.4 Antikörper	23
2.3.4.1 Primäre Antikörper.....	23
2.3.4.2 Direkt-markierte Antikörper	24
2.3.4.3 Markierte Sekundärantikörper und Konjugate	24

2.3.5 Fusionsproteine	24
2.4 Biochemische Arbeiten	25
2.4.1 Reagenzien	25
2.4.2 Puffer	25
2.5 Laborgeräte	28
2.6 Methoden der Zellkultur	30
2.6.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation.....	30
2.6.2 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen.....	30
2.6.3 Zellzählung	30
2.6.4 Zell-Linien und ihre Kultivierung.....	30
2.6.5 Isolierung peripherer Blutlymphozyten	31
2.6.6 Isolierung von T-Zellen aus PBL.....	31
2.6.6.1 Aufreinigung über Schaferthozyten	31
2.6.6.2 Aufreinigung über Nylonwolle	32
2.6.7 Positive Isolierung von CD4 und CD8 Lymphozyten	32
2.6.8 Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (CFDA-SE)	33
2.6.9 Allogene Stimulation der T-Zellen	33
2.6.10 Messung der Zellproliferation durch den Einbau von radioaktivem Thymidin	34
2.6.11 Messung der Zellproliferation mittels CFSE-markierter T-Zellen	35
2.6.12 Durchflusszytometrie (FACS)	35
2.6.12.1 Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)	35
2.6.12.2 Färbung von intrazellulären Molekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)	36
2.7 Proteinbiochemische Methoden	36
2.7.1 Herstellung von Fab-Fragmenten	36
2.7.2 Umpufferung und Proteinkonzentration	38
2.7.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	38
2.7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.7.5 Silberfärbung	38
2.7.6 Coomassiefärbung	39

3. Ergebnisse.....	40
3.1 Blockade von CTLA-4 bei einer allogenen Immunantwort.....	40
3.1.1 Die SkMel Zellen sind mit B7.2 transfiziert.....	40
3.1.2 Aufgereinigte PBL enthalten fast keine APC mehr	41
3.1.3 BNI-3 Fab-Fragment bindet an CTLA-4	42
3.1.4 B7.2 transfizierte SkMel aktivieren T-Zellen.....	43
3.1.5 Die T-Zellen ließen sich nicht jedesmal von den SkMel B7.2 aktivieren	45
3.1.6 Fab-Fragmente gegen CTLA-4 verstärken die Proliferation der T-Zellen; kaum Einfluss des Gesamtantikörpers gegen CTLA-4	46
3.1.6.1 Die Fab-Fragmente gegen CTLA-4 erhöhen leicht die unspezifische Proliferation der T-Zellen	47
3.1.6.2 Die Steigerung der Proliferation ist unabhängig von der Stärke der Kostimulation	48
3.1.7 Wie wirkt die CTLA-4 Blockade?.....	49
3.1.7.1 Wann wirkt CTLA-4?	49
3.1.7.2 Kinetik der T-Zellproliferation mit und ohne Blockade von CTLA-4 ...	50
3.1.7.3 Abschätzung der Vorläufer-Frequenzen.....	59
3.1.7.4 Keine Steigerung der Proliferation durch ein Kontroll-Fab-Fragment ...	59
3.1.8 Die verstärkte Antwort der CD8 T-Zellen nach einer Blockade von CTLA-4 beruht wahrscheinlich auf einer verstärkten Hilfe durch CD4 T-Zellen.	60
3.1.9 T-Zellen zeigen eine erhöhte IFN- γ Produktion nach Blockade von CTLA-4	62
3.1.10 T-Zellen werden durch Stimulation mit Wildtyp Melanomzellen nicht anerg	65
3.2 Das Proliferationsmuster humaner T-Zellen ist unabhängig von der Kostimulation.....	67
3.2.1 Eine Titration der Stärke der Kostimulation hat keinen Einfluss auf die Kinetik der Proliferation	67
3.2.2 Die Blockade der Kostimulation hat keinen Einfluss auf die Kinetik	68
3.2.3 Die Blockade der Kostimulation durch CTLA-4-Ig nach 24 Stunden führt zu keinem Abbruch der Proliferation	70

4. Diskussion	72
4.1 Überblick	72
4.2 Das allogene <i>in vitro</i> Testsystem	72
4.3 Markierung der T-Zellen mit CFSE	73
4.4 Werden Memory oder naive T-Zellen aktiviert?	74
4.5 Warum kommt es z.T. zu keiner Aktivierung?	74
4.6 Aktivierung von T-Zellen durch SkMel Wildtyp	76
4.7 Verbesserungen des Testsystems	76
4.8 Modulation der Immunantwort durch die Blockade von CTLA-4	77
4.8.1 Der Antikörper BNI3 bindet spezifisch an humanes CTLA-4.....	77
4.8.2 Gesamtantikörper oder Fab-Fragment	77
4.8.3 Kein Einfluss durch ein Kontroll Fab-Fragment.....	78
4.8.4 Wie verstärkt eine Blockade von CTLA-4 die spezifische Immunantwort? .	79
4.8.5 Kinetik in der Proliferation Abhängigkeit von der Kostimulation.....	81
4.8.6 Verstärkte Effektorfunktion durch eine erhöhte IFN- γ Expression	83
4.8.7 Gibt es einen direkten Einfluss von CTLA-4 auf CD8-T-Zellen?	84
4.8.8 Werden regulatorische T-Zellen blockiert?	85
4.9 Warum wurde keine Anergie erzeugt?	85
4.10 Bedeutung der Ergebnisse für eine CTLA-4 Blockade in der Therapie	86
4.11 Ausblick	88
5. Zusammenfassung	89
Literaturverzeichnis	91

Abkürzungen

Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bq	1 Becquerel = Anzahl der radioaktiven Zerfallsakte $\cdot s^{-1}$
BCR	B-Zellen Rezeptor (<i>B Cell Receptor</i>)
BSA	Rinderalbumine (<i>bovine serum albumine</i>)
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	copy DNA
CFSE	5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
Ci	1 Curie = 37 Milliarden Becquerel
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbend assay
ERK	extracellular-signal-regulated-kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning
FCS	Fötale Kälber Serum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fyn	fibroblast yes related kinase
g	Erdbeschleunigung = $9,81 m/s^2$
Gy	1 Gray = $1Ws/kg = 100 rad$ (Energiedosis)
h	Stunde
HBS-Puffer	HEPES buffered saline
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonic acid
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
ICOS	induzierbarer Kostimulator (inducible costimulator)
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	immuno-receptor tyrosinebased activation motif
ITIM	immuno-receptor tyrosinebased inhibitory motif
JNK	jun NH ₂ -terminal kinase

Lck	lymphocyte cytoplasmic kinase
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KIR	Killer-Zellen-Inhibitorischer-Rezeptoren (<i>killer cell inhibitory receptor</i>)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
mAK	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger RNA
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle (<i>natural killer cell</i>)
OD	Optische Dichte
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	Programmed Death-1
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
scFv	single chain Fv-fragments
SH2/3	src homology region 2 bzw. 3
SHP	SH containing phosphatase
src	Sarkom (<i>sarcoma</i>)
SRC	Schaferythrozyten (<i>Sheep Red Cell</i>)
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TGF- β	Tumor-growthfactor- β
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TCR	T-Zellen-Rezeptor (<i>T-Cell Receptor</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor- α
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
T _H	T-Helfer-Zelle
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
ZAP-70	ζ -Kette assoziiertes Protein (<i>ζ-chain associated protein</i>)

Danksagung

Herrn Professor Dr. B. Fleischer danke ich für die Überlassung des Arbeitsthemas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Bretting möchte ich mich für die Bereitschaft, diese Dissertation als Gutachter zu lesen und zu bewerten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Bröker für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und für die vielen hilfreichen und zahlreichen Anregungen.

Ein Dankeschön geht an Frau Ulrike Klauenberg, Frau Christiane Steeg und all die anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Fleischer für die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit im Labor und die schöne Zeit – Danke!

Ein besonderer Dank geht noch an meine Eltern und Freunde!

Diese Arbeit wurde am Hamburger
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
in der Abteilung Med. Mikrobiologie und Immunologie
durchgeführt

1. Einleitung

1.1 Die Aufgaben des Immunsystems

Der menschliche Organismus ist für viele Bakterien, Viren und Parasiten ein idealer Lebensraum. Da diese Lebensformen bei der Besiedelung des Körpers schwere Krankheiten hervorrufen können, haben der Mensch und andere höhere Vertebraten im Laufe der Evolution ein komplexes Immunsystem zur Abwehr dieser Krankheitserreger entwickelt. Mit einer Kombination aus angeborenen, antigenunabhängigen und adaptiven, antigenspezifischen Mechanismen hat das Immunsystem ein schlagkräftiges und flexibles Repertoire, um die meisten Erregern und deren Stoffwechselprodukte, aber auch entartete körpereigene Zellen, zu eliminieren oder zu neutralisieren.

Das Immunsystem muss aber sicher zwischen körperfremden oder entarteten Zellen und normalem körpereigenen Gewebe unterscheiden können, da eine Fehlregulation des Immunsystems zu schweren Autoimmunkrankheiten führen kann. Hierbei richtet sich die zerstörerische Kraft nicht gegen körperfremde Zellen, sondern gegen gesundes Gewebe des eigenen Körpers.

Bei der Abwehr von Krankheitserregern ist es meist zuerst die antigenunspezifische Immunantwort die aktiv wird. Diese Antwort wird durch mechanische Barrieren wie der Haut, phagozytierende Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dem Komplementsystem und Lysozym vermittelt.

Danach wird die antigenabhängige Immunantwort aktiviert. Da diese Abwehr spezifisch für ein entsprechendes Antigen ist, ist dieser Teil der Immunantwort besonders effektiv. Die antigenabhängige Immunantwort entwickelt sich erst im Laufe des Lebens, da das Immunsystem erst erlernen muss, neue Antigene als „fremd“ zu erkennen. Hat das Immunsystem aber einmal Kontakt mit einem Pathogen gehabt, besitzt es anschließend ein „Gedächtnis“, sodass bei es bei einer wiederholten Infektion mit dem gleichen Pathogen sehr viel schneller reagieren kann. Die zellulären Hauptkomponenten der antigenabhängigen Immunantwort sind die professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie die dendritischen Zellen und Makrophagen sowie eine Reihe von Lymphozytenpopulationen. Die Lymphozytenpopulationen und andere Zellen werden aus den im Knochenmark vorhandenen pluripotenten Stammzellen gebildet (Abramson et al., 1977; Lemischka et al., 1986). Die Namen leiten sich aus dem Reifungsort der Zellen ab: B-Zellen reifen im Knochenmark (engl.: bone marrow¹), T-Zellen im Thymus. Ein geringer Prozentsatz der Lymphozyten zirkuliert in Blut und Lymphe, während der überwiegende Anteil in den lymphoiden Organen (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques, Tonsillen, Thymus und Knochenmark) lokalisiert ist, wo durch Wechselwirkungen zwischen APC und den Lymphozyten die Ausbildung der Immunantwort erfolgt (Übersicht im Lehrbuch Janeway et al., 2001). An Hand der exprimierten Moleküle und der Morphologie lassen sich Lymphozyten in naive Zellen die noch keinen Kontakt mit Antigen hatten, aktivierte Lymphozyten (Effektorzellen) und langlebige Memory Zellen unterteilen.

¹ Der Name hat seinen Ursprung von der bursa der Vogel, wo die B-Zellen zum erstenmal beschrieben wurden.

1.2 B- und T-Lymphozyten

Die B- und T-Lymphozyten erkennen Antigene über spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und können so eine Immunantwort auslösen. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) besteht aus membranständigen Immunglobulin-Molekülen (Ig). Antigene (Ag) werden von dem B-Zell-Rezeptor und Antikörpern (Ak) unprozessiert in ihrer natürlichen Form gebunden (Poljak, 1991). Aktivierte und ausdifferenzierte B-Zellen, auch als Plasmazellen bezeichnet, sezernieren Antikörper. Im Gegensatz dazu erkennt der T-Zell-Rezeptor (TCR) keine nativen Proteine, sondern nur Peptide, die prozessiert wurden, im Kontext mit dem passenden Haupt-Histokompatibilitäts-Antigen (Major Histocompatibility Complex, MHC) (Doherty et al., 1974; Bjorkman, 1997). Dieses Phänomen wird MHC-Restriktion genannt und beschränkt T-Zellen auf die Erkennung von Zell-gebundenem Antigen.

Während der Reifung der T-Zellen im Thymus werden diejenigen Zellen eliminiert, die körpereigene Antigene erkennen (negative Selektion) und nur solche T-Zellen in die Peripherie entlassen, die MHC I bzw. II Moleküle binden können (positive Selektion).

Die Einzigartigkeit eines jeden Rezeptors wird durch somatische Rekombination der TCR-codierenden Gen-Sequenzen während der Entwicklung der einzelnen T-Zellen erreicht. Dieser Mechanismus sorgt auch für die hohe Diversität des TCR-Repertoire der T-Zellpopulation. Die Vielseitigkeit des BCR wird durch einen ähnlichen Mechanismus erreicht, auch wenn sich dessen Aufbau von dem des TCR unterscheidet. Der heterodimere TCR besteht bei der Hauptpopulation der T-Zellen aus einer α - und einer β -Kette (α : β -TCR). Beide Ketten durchspannen die Membran und weisen jeweils eine konstante und eine variable Region auf. Mit der variablen Region erkennt der TCR das an das MHC gebundene Peptid und bestimmt so die Antigenspezifität der T-Zelle (Übersicht im Lehrbuch Janeway et al., 2001). Eine kleine Population (ca. 5%) exprimiert einen TCR, der sich aus einer γ - und einer δ -Kette zusammensetzt (γ : δ -TCR) und eine insgesamt geringere Diversität in der variablen Region aufweist. Die Funktion der γ : δ -T-Zellen ist weitgehend unbekannt. Anders als die α : β T-Zellen ist der Großteil der γ : δ -T-Zellen nicht in den lymphoiden Organen sondern im Gewebe lokalisiert. Es gibt Daten, die dafür sprechen, dass diese Zellen eher ein Teil des frühen nichtadaptiven Immunsystems sind und ähnlich wie die NK-Zellen allgemeine Veränderungen der Zellen erkennen, darunter auch Nicht-Peptid-Antigene (Hayday, 2000).

Der TCR ist eng aber nicht-kovalent an den CD3-Komplex gekoppelt, welcher aus CD3 γ -, CD3 δ - und CD3 ϵ -Ketten aufgebaut ist. Eng assoziiert ist außerdem ein Dimer aus zwei ζ -Ketten oder einer ζ - und einer η -Kette (Weiss, 1991). Diese Moleküle besitzen ausgedehnte intrazelluläre Regionen und ITAM-Motive (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), die dazu dienen, das Signal des TCR weiterzuleiten (Irving and Weiss, 1991; Letourneur and Klausner, 1992).

Reife α : β -T-Lymphozyten in der Peripherie und den sekundären Lymphorganen lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktion und der exprimierten Korezeptoren in zwei Subklassen unterteilen: Man unterscheidet CD4-positive T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen (CTL), die CD8 exprimieren. Die Differenzierung in CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen vollzieht sich während der T-Zellreifung im Thymus.

Die CD4⁺-T-Helferzellen erkennen Peptid-Antigene, die ihnen im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen (MHCII) auf der Oberfläche von professionellen antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Da nur APC wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen (König, 2002), sind nur sie in der Lage CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren. Die Peptide, die auf MHC Klasse II präsentiert werden, sind ca. 12-24 Aminosäuren (AS) lang und stammen normalerweise von extrazellulären Antigenen, die durch die APC aufgenommen und prozessiert wurden (Rammensee et al., 1995). Der Name T-Helfer-Zellen leitet sich von ihrer Aufgabe ab, die hauptsächlich in der Unterstützung und Kontrolle anderer Zellen des Immunsystems besteht. Aufgrund eines unterschiedlichen Musters in der Zytokinproduktion unterscheidet man bei den CD4⁺-T-Helferzellen zwischen T_H1- und T_H2-Zellen. Aktivierte T_H1-Zellen sezernieren vornehmlich inflammatorische Zytokine wie IL-2 und Interferon-gamma (IFN- γ). IL-2 ist einer der wichtigsten T-Zell-Wachstumsfaktoren, während IFN- γ Makrophagen aktiviert. Diese Klasse von CD4⁺-T-Helferzellen unterstützt damit vor allem die zellvermittelten Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Pathogene. Aktivierte T_H2-Zellen produzieren IL-4, IL-6 und IL-10 und aktivieren und unterstützen so u.a. die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten und fördern auf diese Weise die Eliminierung extrazellulärer Pathogene. IFN- γ , ein Sekretionsprodukt der T_H1-Zellen, hemmt die Differenzierung von T_H2-Zellen, während IL-4 die Entwicklung der T_H1-Zellen inhibiert. Außerdem besitzt IL-10 eine suppressive Wirkung auf inflammatorische Prozesse, indem es Makrophagen inhibiert. Durch solche Rückkopplungsmechanismen wird die einmal eingeschlagene Richtung der T-Zelldifferenzierung (T_H1 oder T_H2) stabilisiert (O'Garra, 1998).

Eine weitere Subpopulation sind die CD4⁺/CD25⁺ Suppressor T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Diese definieren sich vor allem über die hohe Expression der Oberflächenmarker CD25 (IL2 α -Kette), CTLA-4 und die niedrige Expression von CD45RB (Thornton and Shevach, 1998). Sie machen ca. 10 % der CD4⁺-T-Zellen aus. Die Aufgabe dieser Zellen besteht vermutlich darin, die Selbsttoleranz zu erhalten und Autoimmunität durch autoreaktive T-Zellen zu vermeiden. Die genauen Wirkmechanismen sind bisher nicht bekannt, doch vermutlich erfolgt die Suppression vor allem durch Zell-Zellkontakt (Shevach et al., 2001). Eine Schlüsselrolle spielt dort möglicherweise das Molekül GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) (Shimizu et al., 2002). Bekannt ist, dass die Suppression unspezifisch erfolgt und sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺-T-Zellen beeinflusst (Maloy and Powrie, 2001).

Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen erkennen Antigene, die an MHC-Klasse-I-Moleküle (MHCI) gebunden sind. Hierbei handelt es sich um acht bis zehn AS lange Peptide, die meist aus dem Zytoplasma der Zellen stammen. Diese werden prozessiert, in das endoplasmatische Retikulum geschleust und dann an MHC I gebunden auf der Oberfläche präsentiert. MHC I-Moleküle werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Den CTL kommt damit eine besondere Aufgabe bei der Eliminierung virusinfizierter und maligne transformierter Zellen zu. Aktivierte CD8⁺-Zellen lysieren ihre Zielzellen oder lösen bei diesen Apoptose aus. Dabei setzen sie verschiedene Effektormechanismen ein, u.a. die Freisetzung zytotoxischer Granula, die mit Perforin und Proteasen gefüllt sind, oder die Expression des Fas

Liganden, der in Fas-exprimierenden Zellen Apoptose induziert. Aber auch die Sekretion von Zytokinen, vor allem von IFN- γ , spielt bei CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle (König, 2002).

1.3 Aktivierung der T-Lymphozyten

Die Aktivierung naiver T-Zellen beginnt durch die Interaktion des TCR mit einem spezifischen Peptid/MHC-Komplex auf der Oberfläche einer APC. Dieses führt zu einer Kreuzvernetzung und/oder Konformationsänderung des TCR und löst eine Phosphorylierung des CD3-Komplexes aus, obwohl der TCR-Komplex selbst über keinerlei intrinsische Enzymaktivität verfügt. Dies aktiviert eine Reihe von Phosphotyrosinkinasen (PTK's), die über eine Phosphorylierungskaskade von „second messengern“ das Aktivierungssignal über mehrere Wege in den Zellkern leiten. Zusammen mit einem ebenfalls eingeleiteten Einstrom von Calciumionen führt dies zur Transkription von Genen, die für die Proliferation und Aktivierung der T-Zellen verantwortlich sind (Judd and Koretzky, 2000; Lewis, 2001). Aber nur bei schon aktivierten T-Lymphozyten (Effektor- und Memory Zellen) reicht das alleinige Signal über den TCR (Signal 1) für eine vollständige Aktivierung. Bei naiven T-Zellen führt dies hingegen nur zu einer partiellen Aktivierung, gekennzeichnet durch eine Vergrößerung der Zelle und die erhöhte Expression von CD69, CD44 und CD25 (Sagerstrom et al., 1993; Ho et al., 1994).

1.4 Kostimulation

Für die vollständige Aktivierung einer naiven T-Zelle, gekennzeichnet durch IL-2-Sekretion, Proliferation und Differenzierung zur Effektorzelle, bedarf es eines zweiten, kostimulatorischen Signals. Bleibt dieses zweite Signal aus, erfolgt keine weitere Aktivierung, und die T-Zelle wird apoptotisch oder anerg, d.h. sie kann nicht mehr auf weitere Antigene reagieren, auch wenn später ein kostimulatorisches Signal geliefert wird (Maier and Greene, 1998). Für den Organismus ist dieses Prinzip überlebenswichtig, um die periphere Toleranz gegen Selbstantigene aufrecht zu erhalten. Die meisten potentiell selbstreaktiven Zellen werden durch die Mechanismen der zentralen Toleranz während der Reifung im Thymus eliminiert. Dabei werden unreife T-Zellen negativ selektioniert, die ein Selbstantigen mit hoher Affinität erkennen. Trotzdem gelangen regelmäßig T-Zellen in die Peripherie, welche Selbstantigene erkennen können. Treffen sie in der Peripherie auf ihr Antigen auf der Oberfläche einer Körperzelle, werden diese T-Zellen aber nicht vollständig aktiviert, da die Körperzelle keine Kostimulation geben kann. Die kostimulatorischen Moleküle kommen i.A. nur auf den professionellen APC des Immunsystems vor, sodass nur sie in der Lage sind, naiven T-Zellen das Signal zur Umwandlung in eine reife Effektorzelle zu geben (Holdorf et al., 2000). Für die Aktivierung einer reifen T-Zelle bzw. Memory-T-Zellen während einer sekundären Immunantwort ist dann ein deutlich geringeres kostimulatorisches Signal erforderlich (Croft et al., 1994).

1.4.1 Positive Kostimulation durch CD28

Das wichtigste kostimulatorische Signal wird durch die Bindung von CD28 an die beiden strukturell eng verwandten Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) vermittelt. CD80 und CD86 gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und werden sowohl von professionellen antigenpräsentierenden Zellen als auch aktivierten Lymphozyten exprimiert. Deren Ligand CD28 ist ein Homodimer aus zwei Glycoproteinen, gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie und wird konstitutiv auf ruhenden T-Zellen exprimiert (Lenschow et al., 1996). CD28 ist als einziges bisher bekanntes kostimulatorisches Molekül in der Lage, sowohl eine massive, lang anhaltende IL-2-Produktion zu fördern (Yashiro et al., 1998), als auch ein Überlebenssignal zu liefern, das verhindert, dass die T-Zelle bei ihrer Aktivierung anerg wird oder in die Apoptose eintritt (Harding et al., 1992; Sperling et al., 1996). Das Engagement von CD28 führt zu einer erhöhten Zytokinproduktion, Stabilisierung der mRNA und erhöht die Überlebensrate von T-Zellen, da es die verstärkte Expression von anti-apoptischen Genen wie *bcl-x_L* induziert (Fraser and Weiss, 1992; Boise et al., 1995). Die Signaltransduktion durch CD28, das selber auch keine intrinsische Enzymaktivität besitzt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich besitzt CD28 einen von dem TCR unabhängigen Signalweg, doch sind beide Wege eng miteinander verknüpft (Holdorf et al., 2000).

1.4.2 Weitere kostimulatorische Moleküle

Neben CD28 sind weitere Moleküle bekannt, die eine kostimulatorische Funktion bei der T-Zellaktivierung besitzen. Allerdings können diese allesamt nicht das klassische Signal 2 liefern, welches die T-Zelle vor Apoptose oder Anergie bewahrt, sondern verstärken meist die über das TCR-Engagement induzierten Effekte wie Proliferation, Zytokinsekretion und Differenzierung, indem sie u.a. die Adhäsion zwischen der T-Zellen und den APC erhöhen (Watts and DeBenedette, 1999). Es sind in den letzten Jahren eine Reihe von neuen Mitgliedern der B7-Familie bzw. ihre Liganden auf der Oberfläche von T-Zellen beschrieben und untersucht worden. Es hat sich gezeigt, dass die Aufgabe dieser Moleküle nicht nur in der Aktivierung von ruhenden T-Zellen liegt, sondern vor allem lenken sie das Schicksal der schon aktivierten Zellen und haben eine Rolle bei der Toleranzinduktion, beeinflussen die T_H1/T_H2 -Entwicklung oder führen zur Inhibition der T-Lymphozyten. Man kann deshalb auch zwischen positiver und negativer Kostimulation unterscheiden.

ICOS und ICOS-Ligand

Das am besten untersuchte neue Molekül ist ICOS (inducible costimulator), welches nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird (Hutloff et al., 1999; Mages et al., 2000). ICOS ist strukturell eng mit CD28 verwandt, bindet aber nicht an CD80 bzw. CD86. Der ICOS-Ligand (ICOS-L, B7h, GL50, B7RP-1, LICOS, B7-H2,) wird vor allem auf B-Zellen und Makrophagen exprimiert. Zytokine wie IFN- γ und TNF- α können die Expression auch auf nicht-lymphoiden Gewebe z.B. Leber, Niere und Lunge auslösen (Swallow et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999; Brodie et al., 2000; Ling et al., 2000; Mages et al.,

2000; Wang et al., 2000). Sowohl das Engagement von CD28, als auch das von ICOS, induziert die Sekretion von IL-4, IL-5 und IFN- γ (McAdam et al., 2000; Gonzalo et al., 2001a; Riley et al., 2001). Anders als bei CD28 verstärkt das Engagement von ICOS bei gleichzeitiger Stimulation über den TCR die IL-2-Produktion und damit die Proliferation nur geringfügig, erhöht aber deutlich die IL-10-Produktion (Beier et al., 2000; Wang et al., 2000; Gonzalo et al., 2001b; Riley et al., 2001). ICOS Engagement fördert somit die Expression von T_H1 und T_H2 Zytokinen, aber unterstützt vermutlich effektiver eine T_H2-Antwort. Obwohl die Expression von ICOS abhängig von CD28 und TCR-Signalen ist, können CD8⁺-Zellen aus CD28-knock out Mäusen ICOS exprimieren. Dabei zeigt sich, dass ICOS ein Teil der jetzt fehlenden Kostimulation übernehmen kann (Hutloff et al., 1999). Möglicherweise besitzen ICOS und CD28 überlappenden Signaltransduktionswege (Burr et al., 2001; Okkenhaug et al., 2001). Wie Befunde bei ICOS^{-/-} Mäusen zeigen, besteht die Hauptaufgabe von ICOS wahrscheinlich bei der Ausbildung von Keimzentren und der Unterstützung der humoralen Immunantwort z.B. Klassenwechsel bei den Antikörpern, da diese Mäuse u.a. keine IgE-Antikörper bilden können und nur sehr geringe Mengen an IL-4 produzieren (Dong et al., 2001; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001). Das Engagement von ICOS verstärkt die Expression von CD40L, welches den B-Zellen über CD40 Reifungs- und Differenzierungssignale vermittelt (Dong et al. 2001).

PD1 und die Liganden PD-L1 und PD-L2

Ein weiteres Molekül aus dieser Familie ist PD-1 (programmed death-1). Dieses Transmembran-Molekül besitzt ein ITIM-Motiv (immuno-receptor tyrosinebased inhibitory motif), welches dafür spricht, dass PD-1 ein negatives kostimulatorisches Signal vermittelt (Ishida et al., 1992). Es ist eingehend untersucht worden, dass PD-1 eine wichtige Rolle bei der positiven Selektion von Thymozyten im Thymus spielt (Nishimura et al., 1996; Nishimura et al., 2000). PD-1 bindet zwei verschiedene Liganden aus der B7-Familie, die beide erst kürzlich beschreiben wurden. Es handelt sich um PD-L1 (B7-H1) und PD-L2 (B7-DC), welche beide auf einem breiten Spektrum von Zellen exprimiert werden können (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001; Tseng et al., 2001).

Die Interaktion von PD-1 und PD-L1/2 führt zu einer Inhibierung der Proliferation von T-Zellen und auch der Produktion von IL-2, INF- γ und IL-10. Die Liganden PD-L1 und PD-L2 werden möglicherweise von T_H1- und T_H2-Zytokinen unterschiedlich reguliert, d.h. PD-L1 wird während einer T_H1-Antwort induziert und PD-L2 während einer T_H2-Antwort (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Außerdem konnte *in vitro* ein inhibitorischer Effekt auf die Signaltransduktion des BCR gezeigt werden, sodass PD-1 auch bei der Regulation von B-Zellen eine Rolle spielen könnte (Nishimura et al., 1998). Welche genaue physiologische Funktion PD-1 in der Peripherie hat, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Das breite Spektrum der PD-L1 und PD-L2 Expression auch auf Zellen die nicht zum Immunsystem gehören, könnte für eine Funktion bei der Begrenzung einer inflammatorischen Immunantwort oder Aufrechterhaltung der Toleranz in der Peripherie verantwortlich sein (Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001).

Mit B7-H3 ist das bisher letzte Molekül der B7-Familie entdeckt worden (Chapoval et al., 2001). Dieses neuste Mitglied der Familie ist eng mit B7RP-1 verwandt, bindet aber nicht an ICOS. Überhaupt ist der Ligand noch nicht bekannt. Auf Ebene der mRNA wurde eine Expression von B7-H3 in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen. Das Molekül ist aber sehr stark auf unreifen DC exprimiert und wird nach Aktivierung durch LPS und INF- γ herunterreguliert. Kostimulation mit B7-H3 führte *in vitro* zur Proliferation und INF- γ -Produktion von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Welche Funktion dieses hat, bedarf noch weiterer Klärung.

Es ist zu vermuten, dass durch das Human Genome Project weitere potentielle Kandidaten für kostimulatorische Moleküle aus der B7-Familie entdeckt werden, durch die sich dann evtl. bisher widersprüchliche Befunde aufklären lassen.

1.5 Abschaltung der T-Zellen

Während die Schritte, die zu einer Aktivierung von T-Zellen führen, vergleichsweise gut verstanden sind, liegen die Mechanismen der negativen Regulation weitgehend im Dunkeln. Negative Regulation findet sowohl in der frühen Phase der Immunantwort als auch zu späteren Zeitpunkten statt, wenn es darum geht, die Immunantwort wieder abzuschalten. Für eine negative Regulation in der frühen Phase sind mehrere Mechanismen entdeckt worden, die für eine solche Modulation der Immunantwort verantwortlich sein können. Diskutiert wird u.a. der Einfluss von Killer-Zellen-Inhibitorischen-Rezeptoren (KIR) auf die Regulation der T-Zellen (Arase et al., 1997; Burshtyn et al., 1996) das oben erwähnte PD-1 und regulatorische T-Zellen (Ravetch and Lanier, 2000). An den Regulationsmechanismen in der späten Phase der Immunantwort sind vor allem negative Rückkopplungsmechanismen beteiligt. Diese werden ausgelöst durch regulatorische Zytokine und das Fas-System, welche zu einem Stopp der Proliferation oder zur Apoptose (Übersichtsarbeit: Parijs und Abbas, 1998) führen. Thema dieser Arbeit ist CD152 = CTLA-4 (engl.: cytotoxic T lymphocyte antigen-4), das bisher am besten untersuchte Molekül mit einer inhibitorischen Funktion. Trotzdem sind die genauen molekularen Mechanismen der Inhibition noch nicht geklärt. Es gibt Befunde, die zeigen, dass CTLA-4 eine regulatorische Funktion sowohl in der frühen und sehr frühen Phase der T-Zellaktivierung hat, als auch in der Spätphase der Immunantwort von Bedeutung ist.

1.6 Negative Kostimulation durch CTLA-4

CTLA-4 (CD152) wurde 1987 bei der Suche nach Genen identifiziert, die hauptsächlich von differenzierten zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden. Die cDNA von CTLA-4 wurde nach der subtraktiven Hybridisierung einer murinen CTL cDNA-Bibliothek an die RNA eines B-Zell-Lymphoms entdeckt (Brunet et al., 1987). CTLA-4 gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie und besitzt auf der Genebene eine 75%ige Sequenzhomologie zu CD28. Beide Gene liegen beim Menschen zusammen mit ICOS und PD-1 auf Chromosom 2 eng zusammen (Shinohara et al., 1994; Coyle et al., 2000; Mages et al., 2000; Ling et al., 2001). Wie CD28 ist CTLA-4 ein Homodimer aus zwei glycosylierten Peptidketten

von jeweils 35 kDa Größe, die über Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind (Balzano et al., 1992; Linsley et al., 1992). Die Peptidketten des CTLA-4 besitzen jeweils eine Transmembranregion und einen kurzen zytoplasmatischen Teil mit einer Länge von 31 Aminosäuren (AS). Dieser zytoplasmatische Teil des CTLA-4 weist die geringste Homologie zu CD28 auf, ist aber zwischen Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen und Huhn zu 100% konserviert (Dariavach et al., 1988; Harper et al., 1991; June et al., 1994a; Oaks et al., 1996).

CTLA-4 und CD28 binden mit CD80 bzw. CD86 die gleichen Liganden (Linsley et al., 1991). Allerdings bindet CTLA-4 an B7-1 bzw. B7-2 mit einer 50 - 100fach höheren Affinität als CD28. Die höchste Bindungsaffinität besitzt CTLA-4-B7.1 ($K_d = 0,2\mu\text{M}$); CD28-B7.2 die niedrigste ($K_d = 20\mu\text{M}$). CTLA-4-B7.2 und CD28-B7.1 liegen dazwischen (Linsley et al., 1994; Greene et al., 1996; van der Merwe et al., 1997). Aber anders als CD28 vermittelt CTLA-4 keine positive Kostimulation, sondern ist ein Antagonist zu CD28 und inhibiert die Aktivierung von T-Lymphozyten bzw. schaltet einmal aktivierte T-Zellen wieder ab.

Gingen erste Studien noch davon aus, dass es sich bei CTLA-4 um ein positiv kostimulatorisches Molekül handelt (Linsley et al., 1992), so brachten andere Experimente mit kreuzvernetzten Antikörper Hinweise auf eine inhibitorische Rolle (Walunas et al., 1994; Krummel and Allison, 1995). Versuche mit CTLA-4-defizienten Mäusen gaben dann sehr deutliche Anzeichen auf eine negativ-regulatorische Funktion von CTLA-4. Die CTLA-4^{-/-} Mäuse zeigten eine massive Steigerung des Lymphozytenwachstums, das in einer Lymphadenopathie und Splenomegalie resultierte. Eine Expansion der T-Zellen war schon 5-6 Tage nach der Geburt nachweisbar. Die meisten peripheren T-Zellen waren aktiviert, zeigten auch *ex vivo* eine spontane Proliferation und sezernierten diverse Zytokine (IL-2, 3, 4, 6). Die Mäuse starben im Alter von drei bis vier Wochen, nachdem die T-Zellen auch in nichtlymphoides Gewebe eingewandert waren (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995; Chambers et al., 1997). Es zeigte sich, dass es sich um keinen Defekt der zentralen Toleranz handelte, da sich die Zellen im Thymus normal entwickelten (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995; Chambers et al., 1997). Auch ist vermutlich die Apoptose der T-Zellen nicht gestört (Waterhouse et al., 1997; Van Parijs et al., 1999). Die T-Zellen konnten unbegrenzt proliferieren, da ein essentielles negatives Signal durch CTLA-4 fehlte.

Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass es sich bei der Lymphproliferation um eine Autoimmunerkrankung handelt, die von der Anwesenheit von T-Zellen abhängig ist, da ein Kreuzen von CTLA-4^{-/-} Mäusen mit rag^{-/-}-Mäusen den Ausbruch der Krankheit verhindert. Ein Rückkreuzen auf eine TCR-transgene Maus konnte die Autoimmunität nicht wiederherstellen, sodass es vermutlich der spezifischen Aktivierung durch Antigen aus der Peripherie bedarf, um die T-Zellen polyklonal zu stimulieren (Waterhouse et al., 1997; Chambers et al., 1998; Chambers et al., 1999; Van Parijs et al., 1999). Es zeigte sich, dass vor allem CD4⁺-Zellen aktiviert waren und die Pathologie wohl auch von den CD4⁺-Zellen ausgelöst wurde, denn eine Depletion der CD4⁺-Zellen und nicht der CD8⁺-Zellen verhinderte die Lymphproliferation (Chambers et al., 1997). Die Rolle von CTLA-4 bei CD8⁺-Zellen ist unklarer. So können transgene, für ein LCMV-Peptid spezifische CD8⁺-Zellen eine LCMV Infektion in CTLA-4^{-/-}-Mäusen normal bekämpfen (Bachmann et al., 1998). Andere Arbeiten zeigen wiederum, dass bei einer Sekundärantwort in CTLA-4-defizienten

Mäusen auch CD8⁺-Zellen verstärkt proliferieren (Chambers et al., 1998). Ebenfalls verhindern lässt sich die Aktivierung durch eine vollständige Blockade der CD28-abhängigen Kostimulation entweder durch Gabe von CTLA-4-Ig oder durch Rückkreuzen von CTLA-4^{-/-} Mäusen auf CD80/CD86 defiziente Mäuse (Tivol et al., 1997; Mandelbrot et al., 1999). Zusammengenommen haben diese Ergebnisse gezeigt, dass es sowohl spezifischer TCR als auch CD28 bedarf, um als erstes die CD4⁺-Zellen und anschließend die CD8⁺ zu aktivieren. Die normale Funktion von CTLA-4 liegt demnach in dem Abschalten und Begrenzen der Proliferation von aktivierten T-Zellen. *In vitro* Versuch mit Antikörpern haben allerdings Hinweise darauf gegeben, dass eine Blockade des CTLA-4 auch schon die Aktivierung von naiven T-Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt beeinflussen kann (Brunner et al., 1999).

1.6.1 Expression

Anders als beim CD28, welches konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression von CTLA-4 streng reguliert. Auf ruhenden T-Zellen ist eine Expression des CTLA-4 mittels Oberflächenfärbung und Northern Blot nicht detektierbar (Linsley et al., 1992; Walunas et al., 1994; Krummel and Allison, 1996). Nur mittels RT-PCR ließ sich zumindest eine Expression auf der mRNA-Ebene zeigen (Chambers and Allison, 1997). Nach einer Aktivierung von T-Zellen wird die Expression von CTLA-4 sehr schnell verstärkt. Bereits nach einer Stunde ist dies bei der mRNA sichtbar. Die Oberflächenexpression ist nach ca. vier Stunden *in vitro* und *in situ* nachweisbar und erreicht den höchsten Wert nach 24-48 Stunden (Lindsten et al., 1993). Trotzdem ist das Expressionsniveau insgesamt sehr niedrig: es erreicht nur 2-3% des Expressionsniveaus von CD28 auf den gleichen Zellen (Linsley et al., 1992).

Die Expression des CTLA-4 ist nicht nur auf Transkriptionsebene reguliert. Zusätzlich wird die Oberflächenexpression durch gezielte Endo- und Exozytose von CTLA-4-beladenen Vesikeln reguliert. Die Immunfluoreszenzanalysen CTLA-4-transfizierter Zellen haben gezeigt, dass ein Großteil des CTLA-4 auch in aktivierten Zellen in intrazellulären Kompartimenten vorliegt und nicht auf der Oberfläche exprimiert wird (Leung et al., 1995). Die Akkumulation auf der Oberfläche wird durch eine schnelle aktive Internalisierung mittels Clathrin-vermittelter Endozytose verhindert (Chuang et al., 1997). Die Endozytose wird durch eine Assoziation des zytoplasmatischen Teils des CTLA-4 mit der μ -Untereinheit der mittleren Kette des Clathrin-assoziierten Adaptor-Komplex AP-2 vermittelt (Shiratori et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz Tyr-x-x- \otimes (wobei x eine beliebige Aminosäure und \otimes eine große hydrophobe Aminosäure ist), allgemein eine Assoziation des betreffenden Proteins mit der μ -Kette des AP-Komplexes auslöst und so für die Internalisierung verantwortlich ist (Ohno et al., 1995). Beim CTLA-4 lautet das entsprechende Motiv Tyr-Val-Lys-Met. Das Tyr165 spielt dabei die entscheidende Rolle, denn Tyr 165-Deletionsmutanten konnten nicht mehr an μ -2 binden und zeigten eine lang anhaltende stabile Oberflächenexpression (Leung et al., 1995).

Shiratori und Kollegen konnten zeigen, dass auch eine Phosphorylierung von Tyr165 (beim Menschen Tyr201) die Internalisierung verhindern kann (Shiratori et al., 1997). Die-

se Phosphorylierung wird von src-Kinasen durchgeführt, die durch die Signaltransduktion über den TCR aktiviert werden. An der Interaktion mit CTLA-4 in T-Zellen sind vermutlich die src-Kinasen Fyn und Lck beteiligt (Miyatake et al., 1998; Chuang et al., 1999; Chikuma et al., 2000). Die Regulation der Expression stellt sich folgendermaßen dar: In nicht aktivierten Zellen liegt das wenige exprimierte CTLA-4 intrazellulär vor. Gelangt dennoch welches an die Oberfläche, assoziiert CTLA-4 mit dem nicht phosphorylierten Tyr165 an AP-2 und wird sofort internalisiert. Nach einer Aktivierung der T-Zellen wird die Expression von CTLA-4 massiv erhöht und ist auch dann hauptsächlich interzellulär lokalisiert. Im Zuge der Aktivierung wird aber das Tyr165 durch src-Kinasen phosphoryliert und CTLA-4 verbleibt dann länger an der Zelloberfläche. Doch auch in aktivierten Zellen scheint das CTLA-4 ständig zwischen der Zelloberfläche und den Zellkompartimenten zu zirkulieren (Linsley et al., 1996).

Außer auf T-Zellen konnte eine Expression von CTLA-4 auch auf *in vitro* aktivierten humanen B-Zellen gezeigt werden (Kuiper et al., 1995; Steiner et al., 2001). Pioli et al. konnten zeigen, dass CTLA-4 auf B-Zellen durch CD40-Ligation und Gabe von IL-4 exprimiert wird. Auch auf B-Zellen übt CTLA-4 einen inhibitorischen Einfluss aus (Pioli et al., 2000).

1.6.2 Molekulare Inhibitionsmechanismen und Signaltransduktion

Während die Funktion von CTLA-4 auf Populations- und auch Zellebene recht gut verstanden ist, ist der genaue molekulare Mechanismus, wie CTLA-4 inhibierend wirkt noch nicht geklärt. So ist trotz eingehender Forschung die Signaltransduktion durch CTLA-4 bisher recht unvollständig aufgeklärt. Dass der zytoplasmatische Teil bei allen bisher untersuchten Arten zu 100% konserviert ist, signalisiert einen hohen evolutionären Druck diesen Teil unverändert zu lassen (Dariavach et al., 1988; Harper et al., 1991; June et al., 1994b; Oaks et al., 1996; Ohno et al., 1999). Dies deutet auf eine wichtige Rolle bei der CTLA-4-Funktion hin. Möglicherweise ist aber auch nur die Regulation der Oberflächenexpression für die Funktion von CTLA-4 extrem wichtig. Der zytoplasmatische Teil des Moleküls besitzt wie beim CD28 keinerlei eigene enzymatische Aktivität und enthält auch kein ITIM-Motiv wie das PD-1 (Ishida et al., 1992). CTLA-4 hat zwei Tyrosine sowie eine Prolin-reiche Region am Ende des zytoplasmatischen Teils (Chikuma et al., 2000). Eine Aktivierung über den TCR führt zu einer Phosphorylierung von endogenem CTLA-4, ob diese allerdings nur für die Oberflächenexpression von Bedeutung ist, oder auch für die Funktion des CTLA-4 eine Rolle spielt, wird noch diskutiert. Eine Reihe von wichtigen Molekülen aus der Signalkaskade des TCR sind in CTLA-4 knock out Mäusen hyperphosphoryliert, was zu der Annahme führte, dass CTLA-4 in normalen Mäusen eine Phosphorylierung begrenzt, in dem es z.B. Phosphatasen rekrutiert (Marengere et al., 1996). Es konnte eine Interaktion der SH containing phosphatase 2 (SHP-2) mit CTLA-4 und dem TCR gezeigt werden (Schneider and Rudd, 2000). Da dies aber in *in vitro* Überexpressionssystemen geschah und andere Arbeitsgruppen keine Funktion von SHP-2 zeigen konnten, bleibt die Rolle von SHP-2 kontrovers (Baroja et al., 2000; Cinek et al., 2000). Diskutiert wird außerdem eine Interaktion mit SHP-1, JAK2 und neuerdings den Phosphatasen PP2A und PP6 (Chuang et al., 2000). Während diese und andere Daten eher

von einem Einfluss des CTLA-4 auf die Phosphorylierung unmittelbar am TCR (CD3 ζ) sprechen, zeigen andere Arbeiten eine Intervention erst auf der Ebene der ERK und Jun-N-terminal Kinase (JNK) im MAP-Kinase Signalweg (Calvo et al., 1997). Eine neue Arbeit hat zeigen können, dass eine Kolligation von CD3 und CTLA-4 in ruhenden T-Zellen zu einer Inhibition der Phosphorylierung des Tyr319 von ZAP70 durch SHP-1 führt. Dies verhindert dann die Bindung von p56^{lck} an ZAP70 und blockiert so die weitere Signaltransduktion (Guntermann and Alexander, 2002). Auf der Ebene der Transkription führt die CTLA-4-Ligation letztendlich zu einer Inhibition der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NF-AT und AP-1 (Fraser et al., 1999; Olsson et al., 1999).

Diskutiert wird auch eine Inhibition dadurch, dass die für eine Signaltransduktion vom TCR zum Kern wichtigen Kinasen vom CTLA-4 praktisch „weggefangen“ werden. Die Kinasen binden an CTLA-4 und werden bei der Internalisierung aus dem Bereich des TCR entfernt und können das Signal nicht weiterleiten. Dies könnte evtl. erklären, warum man eine Bindung von SHP-2 an CD28 und CTLA-4 zeigen konnte.

Neben einer Inhibition durch ein direktes intrazelluläres Signal ist CTLA-4 auch in der Lage durch eine Kompetition mit CD28 um die Liganden B7.1 und B7.2 die Kostimulation und damit die Aktivierung der T-Zellen zu stoppen (Nakaseko et al., 1999). Zwar ist die Expression des CTLA-4 insgesamt sehr viel geringer als die des CD28, doch kolokalisiert CTLA-4 mit dem TCR an der Kontaktstelle zwischen der T-Zelle und der APC (Linsley et al., 1996) und findet sich in der immunologischen Synapse (Egen and Allison, 2002). Dadurch könnte die lokale Konzentration an CTLA-4 im Bereich der Kontaktstelle höher sein als die von CD28. Möglicherweise ist dies vor allen dort entscheidend, wo die B7-Expression schwach ist (Carreno et al., 2000). Die stärkere Affinität der Liganden zu CTLA-4 würde dann zu einer bevorzugten Bindung an CTLA-4 führen und ein Engagement von CD28 verhindern. Für diese These spricht, dass CTLA-4 ohne den zytoplasmatischen Teil in der Lage ist, u.U. eine Immunantwort zu inhibieren (Nakaseko et al., 1999; Baroja et al., 2000). Dass dieses alleine aber nicht ausreicht, wurde dadurch gezeigt, dass die Expression von trunkiertem CTLA-4 in CTLA-4^{-/-}-Mäusen das Einsetzen der Lymphproliferation zwar verzögert, es aber nicht verhindern konnte (Masteller et al., 2000).

Die Aufklärung der Struktur der Bindung von CTLA-4 an B7 hat weitere Hinweise geliefert, wie CTLA-4 allein durch die Bindung an B7 das kostimulatorische Signal stören kann. Beide Moleküle sind Homodimere und es scheint, als binde ein CTLA-4-Molekül jeweils zwei B7-Moleküle. Auf diese Weise bildet sich dann ein hochaffiner Multimerkomplex (Schwartz et al., 2001; Stamper et al., 2001). Dieses, zusammen mit der höheren Affinität von B7 an CTLA-4 (die möglicherweise auch aus dieser Struktur entsteht), könnte dazu führen, dass der geordnete Aufbau der immunologischen Synapse so gestört wird, dass wichtige Signalmoleküle nicht mehr zueinander finden. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass CTLA-4 nur in *cis* mit dem TCR wirkt und nicht wie CD28 in *trans*, wenn B7 auf einer antigen-defizienten Zelle exprimiert wird (Griffin et al., 2000). Die unterschiedlichen Kinetiken der B7.1 und B7.2 Expression haben zu der Hypothese geführt, dass konstitutiv oder sehr schnell exprimiertes B7.2 für die Aktivierung der T-Zellen verantwortlich ist und B7.1 anschließend für die Fortdauer der Immunantwort. B7.1

wird erst nach 3-4 Tagen auf der Oberfläche vieler APC exprimiert (Lenschow et al., 1996). B7.1 bildet dann mit CTLA-4 einen extrem stabilen Komplex, der zum Abschalten der T-Zellen führt.

Wahrscheinlich spielen beide Wege, die direkte Signalweiterleitung und die Konkurrenz mit CD28 um B7, bei der negativen Regulation durch CTLA-4 eine Rolle. Möglicherweise tun sie dies zu unterschiedlichen Zeitpunkten und bei unterschiedlicher Stärke des TCR und CD28-Signals.

1.6.3 CTLA-4 beeinflusst den Zellzyklus, nicht den Zelltod

Unabhängig davon, wie CTLA-4 ein negatives Signal weiterleitet, im Endeffekt führt ein Engagement von CTLA-4 zu einer Reduktion der IL-2 Produktion und verminderten IL-2-Rezeptor Expression (Krummel and Allison, 1996). Daraus resultierend wird die weitere Aktivierung der T-Zelle verhindert. Dieser Vorgang unterscheidet sich aber von dem Aktivierungs-induzierten-Zelltod durch Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 die Expression von anti-apoptotischen *bcl-x_L*-Genen nicht beeinflusst (Blair et al., 1998) und die FAS/FAS-L-vermittelte Apoptose auch in CTLA-4-defizienten Mäusen funktioniert. Die Beobachtung, dass T-Zellen nach CTLA-4-Engagement durch Apoptose sterben (Gribben et al., 1995), ist vermutlich kein direkter Effekt, sondern auf den dadurch ausgelösten IL-2-Mangel zurückzuführen. Es scheint vielmehr so, als würde ein Engagement von CTLA-4 ein Fortschreiten des Zellzyklus aktiv verhindern. Versuche mit normalen und CTLA-4-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass aktivierte T-Zellen klonal expandieren, diese Expansion aber in normalen Mäusen durch die verstärkte Expression von CTLA-4 nach ca. drei Zellzyklen gestoppt wird, während in CTLA-4^{-/-}-Mäusen keinen Kontrollmechanismus zu existieren scheint, der diese Expansion limitiert (Doyle et al., 2001). Ein Engagement von CTLA-4 führt demnach in normalen Zellen zu einem Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase und verhindert einen Übergang zur S1-Phase (Greenwald et al., 2002). Verursacht wird dies durch eine Inhibition der TCR-induzierten Produktion von cdk 4, cdk 6 und Cyclin D3. Außerdem verhindert CTLA-4-Engagement den CD28-induzierten Abbau von p27^{kip1}, einem Zellzyklus Inhibitor (Brunner et al., 1999).

1.6.4 CTLA-4 und Toleranz

Eine wichtige Funktion hat CTLA-4 offensichtlich bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Arbeiten in mehreren *in vivo* Mausmodellen konnten zeigen, dass CTLA-4 möglicherweise bei der Induktion, aber vor allem bei der Aufrechterhaltung der Toleranz eine entscheidende Bedeutung hat (Karandikar et al., 1996; Luhder et al., 1998; Karandikar et al., 2000; Hurwitz et al., 2002). Eine potentiell autoreaktive T-Zelle, die in der Peripherie ihr Antigen sieht würde nicht aktiviert werden, da die Kostimulation in Form von B7 fehlt. Gleichzeitig würde diese Zelle durch CD3-Ligation induziertes CTLA-4 exprimieren, welches bei einem nachfolgenden Kontakt mit dem Antigen in Kombination mit B7 dafür sorgt, dass die Aktivierungsschwelle der T-Zelle so weit angehoben wird, dass die selbstreaktive T-Zelle nicht aktiviert werden kann. In NOD-Mäusen, die spontan einen

schweren Diabetes entwickeln, führt eine Blockade des CTLA-4 zu einem frühzeitigen Ausbruch der Krankheit und einem schweren Verlauf (Luhder et al., 1998). Kontrovers diskutiert wird noch die Frage, ob CTLA-4 nur eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Toleranz, oder auch bei der Induktion der Toleranz spielt (Perez et al., 1997; Samoiloova et al., 1998; Walunas and Bluestone, 1998). Werden in einem EAE-Modell Mäuse mit fixierten Splenozyten tolerisiert, sodass eine anschließende Immunisierung den Ausbruch der Krankheit verhindert, kann die Gabe von anti-CTLA-4 während der Tolerisierung dieses nicht verhindern. Blockiert man CTLA-4 allerdings gleichzeitig mit der Immunisierung, werden die tolerisierten Zellen wieder aktiv (Eagar et al., 2002). Neben einem direkten Einfluss bei der Toleranzaufrechterhaltung wird diskutiert, ob CTLA-4 auch eine aktive Rolle bei der Funktion von regulatorischen T-Zellen spielt. Auch bei Menschen wird CTLA-4 mit einigen Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht. Allerdings gibt es keine direkten Beweise, sondern es handelt sich um Studien, die versuchen, einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen in der CTLA-4-Genregion und der Suszeptibilität von Krankheiten zu belegen (Holopainen and Partanen, 2001; Chang et al., 2002).

1.6.5 CTLA-4 und regulatorische T-Lymphozyten

CTLA-4 ist mit der Funktion der erst kürzlich beschriebenen regulatorischen T-Zellen in Zusammenhang gebracht wurden, da diese neben CD25, wenig CD45RB und CD4 auch CTLA-4 konstitutiv exprimieren (Salomon et al., 2000; Takahashi et al., 2000). Aber in wieweit CTLA-4 auch zu den regulatorischen Eigenschaften der T_{reg} aktiv beiträgt, ist ungewiss. Zwar sind die T_{reg} hyporesponsiv und produzieren z.B. kein IL-2 (Thornton and Shevach, 1998). Dies könnte möglicherweise auf den Einfluss von CTLA-4 zurückzuführen sein, da ein Engagement von CTLA-4 die IL-2 Produktion unterbindet, doch es konnte gezeigt werden, dass auch T_{reg} aus CTLA-4^{-/-}-Mäusen eine, wenn auch schwächere, regulatorische Wirkung haben (Takahashi et al., 2000).

Eine weitere Hypothese besagt, dass der Phänotyp der CTLA-4^{-/-}-Mäuse auf dem Ausfall eines löslichen Faktors beruht und dass die Ligation von CTLA-4 im normalen Organismus die Ausschüttung eines inhibitorischen Zytokins induziert. Ein Kandidat dafür ist TGF- β (Metzler et al., 1999; Gomes et al., 2000). Jedoch konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 auch in TGF- β ^{-/-}/Smad3^{-/-}-Mäusen die Proliferation von T-Zellen inhibieren kann und dass CTLA-4^{-/-} Mäuse normale Mengen TGF- β produzieren (Sullivan et al., 2001). Außerdem führt in diesen Studien die Kreuzvernetzung von CTLA-4 in normalen Mauszellen nicht zur Produktion von TGF- β . Ohne einen (unbekannten) löslichen Faktor zu postulieren, sind allerdings die Ergebnisse sehr schwer zu erklären, dass Knochenmarkchimäre aus CTLA-4^{-/-}- und Wildtypmäusen keine Lymphproliferation etc. entwickeln (Bachmann et al., 2001).

1.6.6 CTLA-4 und die Aktivierung von T-Lymphozyten

Während es den Anschein hat, dass in den CTLA-4^{-/-}Mäusen vor allem die Sekundärantwort durch das Fehlen von CTLA-4 beeinflusst wird und CTLA-4 in normalen Zellen eine Rolle bei der Abschaltung und Begrenzung der Immunantwort spielt, zeigen viele *in vitro* Versuche inhibitorische Wirkung schon in den frühen Stadien der Aktivierung von naiven Zellen. So konnte die Inhibition der Induktion von IL-2 durch kreuzvernetzte Antikörper schon nach 4 h nachgewiesen werden (Brunner et al., 1999). Dies bedeutet auch, dass auf naiven T-Zellen bzw. schon nach wenigen Stunden physiologische Mengen von CTLA-4 auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden müssen. In Abb. 1 ist ein vereinfachtes Modell dargestellt, wie die Integration der verschiedenen Signale von CD28, CTLA-4 und TCR zu einer Aktivierung oder Attenuierung der T-Zellantwort führen kann. Ein starkes TCR-Signal ohne Kostimulation führt zur Anergie, die vermutlich irreversibel ist (Abb. 1.A). Durch das TCR-Engagement wird eine geringere Menge CTLA-4 exprimiert. Dieses spielt eventuell bei der Aufrechterhaltung der Anergie/Toleranz eine wichtige Rolle (siehe oben). Erhält eine T-Zelle ein starkes TCR-Signal von einer nur schwach aktivierten APC ist die Menge an B7 limitierend und TCR-induziertes CTLA-4 kann aufgrund seiner höheren Affinität CD28 aus der Bindung zu B7 verdrängen und so die Aktivierung stoppen (Abb. 1B). Evtuell erhöht dies auch nur die Aktivierungsschwelle für die T-Zelle, sodass dies nicht zur Anergie führt und die T-Zellen bei einer nachfolgenden Stimulation mit ausreichend Kostimulation zur Proliferation gebracht werden können. Wird eine T-Zelle von einer aktivierten APC mit viel B7 stimuliert, ist die Menge an CTLA-4-limitierend und das restliche B7 kann erfolgreich an CD28 binden, wie in Abb. 1C dargestellt. Dies führt dann zur IL-2-Produktion und anschließender Proliferation der T-Zelle. Eine durch die Aktivierung der T-Zelle induzierte verstärkte CTLA-4 Expression führt dann später zu einem Abbruch der Proliferation. Hat die stimulierte T-Zelle einen TCR der nur eine niedrige Affinität zu dem von der aktivierten APC präsentierten Peptid aufweist, reicht die durch CTLA-4 vermittelte Inhibition aus, um das schwache TCR-Signal zu blockieren (Kuhns et al., 2000). Auch hier kommt es zu keiner oder nur schwachen Proliferation der Zellen.

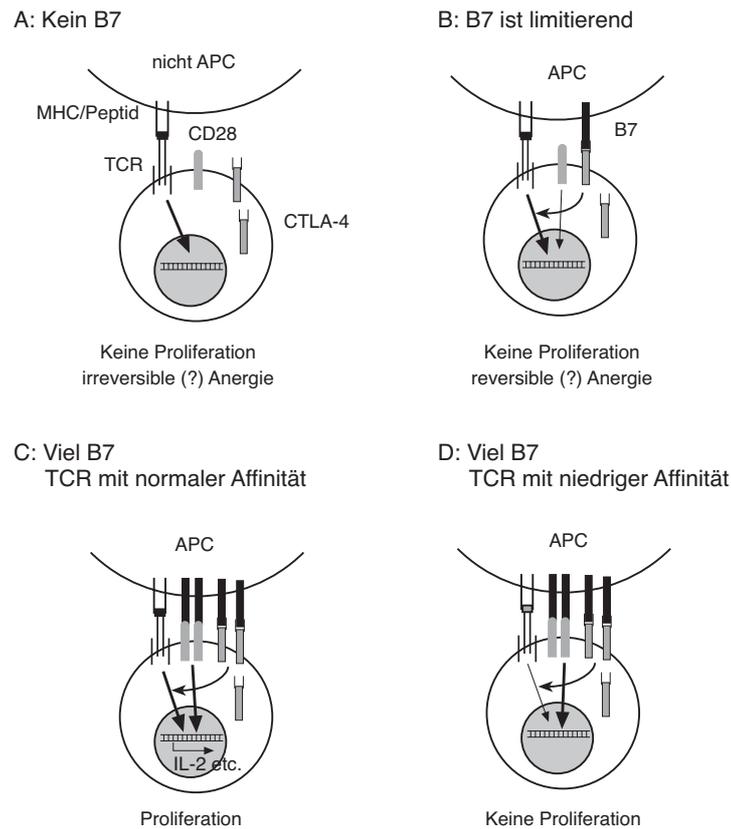


Abb.1 Modell zum Einfluss des CTLA-4 auf die Aktivierung von T-Zellen.

CTLA-4 beeinflusst wohl auch, wie polyklonal eine T-Zellantwort ausfällt. Auf der einen Seite verhindert das Engagement von CTLA-4, dass T-Zellen mit einem niedrig-affinen TCR aktiviert werden. Auf der anderen Seite inhibiert CTLA-4 wohl auch besonders stark aktivierte T-Zellen (Chambers et al., 1999). Bei Versuchen in transgenen Systemen mit starken und schwachen Agonisten hat sich gezeigt, dass CTLA-4 besonders die Immunantwort auf die starken Agonisten inhibiert (Kuhns et al., 2000). In einer normalen nicht manipulierten Maus bewirkt die Gabe von anti-CTLA-4 eine relative Vermehrung antigenspezifischer T-Zellen und eine Erhöhung der mittleren Affinität der aktivierten Zellen.

Eine Erklärung, warum gerade T-Zellen mit einem besonders hochaffinen TCR reguliert werden, könnte sein, dass diese auch am meisten CTLA-4 exprimieren. Dabei korreliert nicht die absolute Menge an CTLA-4 mit der Funktion (Alegre et al., 1998), sondern bei starker Aktivierung über den TCR kommt es auch zu einer verstärkten Translokation des CTLA-4 zur immunologischen Synapse (Egen and Allison, 2002).

CTLA-4 hat in der T-Zelle wahrscheinlich mehrere Aufgaben: 1.: In ruhenden T-Zellen verhindern geringen Mengen CTLA-4 auf der Oberfläche eine Aktivierung durch ein schwaches TCR-Signal und/oder limitierende B7-Level. 2.: Wird eine autoreaktive T-Zelle in der Peripherie nur durch den TCR aktiviert, sorgt darauf hin exprimiertes CTLA-4 dafür, dass bei einer nachfolgenden Stimulierung mit B7 die Aktivierungsschwelle nicht erreicht werden kann. 3.: Wird eine T-Zelle aktiviert, kann CTLA-4 immer noch regulierend

eingreifen. Die erhöhte Expression bei sehr starker Aktivierung und daraus resultierende Attenuierung der T-Zellantwort würde dann verhindern, dass ein einzelner T-Zellklon die Immunantwort dominiert. Wenn keine externen Signale dies verhindern, stoppt die Expression von CTLA-4 nach einigen Zellzyklen den Übergang von der G1/0-Phase in die S1 Phase und blockiert so die weitere Proliferation. Zusätzlich wird (über unbekannte Signalwege) die Expression von IL-2 und IL-2-Rezeptor gestoppt und die Aktivierung der T-Zellen inhibiert.

1.7 Manipulation der Kostimulation

Vermutlich ist das Immunsystem nicht nur in der Lage Infektionen abzuwehren, sondern auch maligne Transformationen von körpereigenen Zellen zu erkennen. Obwohl eine solche Aufgabe von T-Zellen noch diskutiert wird, ist es bekannt, dass viele Tumore Antigene präsentieren, die potentiell von T-Zellen erkannt werden können. Die meisten Tumore sind aber auch dann nur schwach immunogen und können keine T-Zellantwort auslösen, da sie keine Liganden für die Kostimulation exprimieren. Dieser Umstand führt dann dazu, dass die T-Zellen statt den Tumor anzugreifen anerg bzw. tolerant werden.

Es hat sich gezeigt, dass es möglich ist, Tumorzellen *ex vivo* mit B7.1 oder B7.2 zu transfizieren und Mäuse dann mit den Transfektanten zu vakzinieren. Die B7-exprimierenden Tumorzellen dienen als APC für die T-Zellen. Sie initiieren eine Immunantwort, die in der B7-unabhängigen Effektorphase zu einer Eliminierung der nicht-transfizierten Tumore führt. Diese Versuche wurden erfolgreich im Mausmodell durchgeführt, wobei die Transfektanten eine effektive Immunabwehr auslösten, die z.T. in vollständiger Eliminierung der B7-negativen Tumore resultierte. Außerdem wurde ein immunologisches Gedächtnis etabliert, sodass eine spätere Gabe von Tumorzellen nicht mehr zum Ausbruch von Krebs führte. Allerdings war diese Vakzinierung bei schon etablierten Tumoren weniger effektiv. Ähnliche Studien wurden *in vitro* mit humanen Zellen durchgeführt, und auch dort gelang es, die Immunantwort gegen Melanomzellen durch B7-transfizierten Tumorzellen zu verstärken. Bei anderen mit B7-transfizierten Tumorzellen war dies jedoch nicht erfolgreich. Möglicherweise exprimierten diese Tumorzellen keine Peptide, die von T-Zellen erkannt werden, oder die Dichte der präsentierten Peptide war insgesamt zu gering, um eine Immunantwort auszulösen (Übersichtsarbeiten: (Allison et al., 1995; Antonia, 1999)).

1.7.1 CTLA-4-Blockade und Tumorabwehr

Doch trotz der Unkenntnis über die genauen Mechanismen, mit denen CTLA-4 die T-Zellenantwort inhibiert, konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der negativ-regulatorischen Funktion von CTLA-4 zu einer Verstärkung der T-Zellantwort führen kann (Walunas et al., 1994; Kearney et al., 1995; Krummel and Allison, 1995; Krummel et al., 1996). Daraus resultierte die Überlegung, ob eine solche Blockade auch in der Krebstherapie einsetzbar ist. Auf diese Weise ließe sich dann eine schwache Immunantwort ausreichend verstärken. Es hat sich gezeigt, dass eine Blockade von CTLA-4 bei einer Reihe von experimentellen Tumorerkrankungen in Mäusen zu einer erfolgreichen Bekämpfung des

Tumors führte, dazu zählten colorectales Carcinom, Nierencarcinom, Lymphom und Fibroblasten Zell-Linien (Leach et al., 1996; Yang et al., 1997; Shrikant et al., 1999; Sotomayor et al., 1999). In einigen Modellen war es möglich, den Tumor auch noch dann zu bekämpfen, wenn die Gabe der anti-CTLA-4 Antikörper erst 14 Tage nach Implantation der Tumorzellen erfolgte (Leach et al., 1996) oder Tumor-induzierte Hyporesponsivität aufzuheben (Shrikant et al., 1999; Sotomayor et al., 1999). In all diesen Systemen scheint es so, als wird eine positiver Effekt nur dann erreicht, wenn der Tumor eine zumindest geringe Immunogenität aufweist. Durch die Kombination von anderen Strategien mit der CTLA-4-Blockade kann man dieses Problem möglicherweise lösen. Als erfolgreich hat sich kombinierte Gabe von anti-CTLA-4-Ak mit GM-CSF (engl. = granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor) transfizierten Tumorzellen erwiesen (Dranoff et al., 1993; Dunussi-Joannopoulos et al., 1997; van Elsas et al., 1999). Auch zusammen mit einer niedrig dosierten Chemotherapie konnte eine Blockade von CTLA-4 zur erfolgreichen Eliminierung eines Tumors beitragen (Mokyr et al., 1998).

Die Bekämpfung eines Tumors durch eine solche Immuntherapie hätte den Vorteil, dass man keine Kenntnisse über die genauen tumorspezifischen Antigene haben muss. Allerdings besteht die Gefahr, dass es auf diese Weise auch autoreaktive T-Zellen generiert werden, da CTLA-4 auch eine Rolle bei der aktiven Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz spielt.

1.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Durch die kombinierte Gabe von B7-transfizierten Tumorzellen und blockierenden Antikörpern gegen CTLA-4 konnten im Tiermodell beachtliche Erfolge bei der Tumorstabilisierung und Bekämpfung erzielt werden. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob man mit vergleichbaren Mitteln auch bei Menschen die Immunantwort gegen Tumorzellen verstärken kann.

Hierzu sollte ein *in vitro* Modell etabliert werden, welches die Immunreaktion auf Tumorantigenen imitiert. Wir wählten eine allogene T-Zellantwort auf Melanomzellen. Allo-MHC und -Peptid imitierten hierbei tumorspezifische Antigen/MHC-Komplexe. Wildtyp-Melanomzellen, welche kein B7 exprimierten, repräsentierten die Situation im Tumor selbst. Die Transfektanten, welche B7.1 oder B7.2 trugen sollten die Präsentation von Tumorantigenen auf professionellen APC abbilden. Für das Auslösen einer alloge- nen Immunantwort standen die Varianten einer Melanomzell-Linie zur Verfügung, die mit B7.2 transfiziert war (SkMel63 wt und SkMel63 B7.2). Als Effektorzellen wurden aufgereinigte T-Zellen von freiwilligen gesunden Spendern verwendet. Die Immunantwort wurde durch Messung der Proliferation mittels ³H-Thymidin-Einbau in die DNA und CFSE-markierten T-Zellen charakterisiert.

Zunächst galt es, das Testsystem zu etablieren, um festzustellen, unter welchen Bedingungen es zu einer optimalen Immunreaktion zwischen den Stimulatorzellen und den T-Zellen kommt. Danach sollte der Einfluss einer CTLA-4-Blockade auf die Proliferation untersucht werden. Verglichen werden sollte der unmodifizierte Gesamtantikörper gegen CTLA-4 mit dem korrespondierenden Fab-Fragment. Es ist nicht auszuschließen, dass die bivalenten Gesamtantikörper zwar die Bindung an CD86 blockieren, gleichzeitig aber die Signale durch CTLA-4 auslösen. Durch die monovalenten Fab-Fragmente sollte die Bindung an CD86 blockiert werden, ohne dass ein inhibitorisches Signal ausgelöst wird. Ferner sollte versucht werden zu klären, durch welche Mechanismen eine mögliche Verstärkung der T-Zellantwort ausgelöst wird.

2 Material und Methoden

I Material

2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit es nicht anders vermerkt ist, in größtmöglicher Reinheit von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.2 Plastik- und Glaswaren

Centricon 10 kDa	<i>Millipore, Bedford, MA, USA</i>
FACS-Röhrchen (Polystyren Reagenzglas mit Rundboden)	<i>Becton Dickson, Mountain View, CA USA</i>
Gewebekulturflaschen 10 ml, 30 ml und 100 ml	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Gewebekulturplatten:	
6 Vertiefungen	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
24 Vertiefungen	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
96 Vertiefungen (Mikrotiterplatten)	
Rund- und Flachbodenplatten	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Glaspipetten	<i>Brand, Wertheim</i>
Kanülen	<i>Braun, Melsungen</i>
Kryoröhrchen	<i>Nunc, Roskilde, Dänemark</i>
Mehrweghahn Discifix	<i>Braun, Melsungen</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt, Nürnberg</i>
	<i>Gilson, Villiers-le-bel, Frankreich</i>
Platten für die Proteinbestimmung (96 Vertiefungen)	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Spritzen	<i>Braun, Melsungen</i>
Sterilfilter, 0,22 µm Expresß	<i>Millipore, Bedford, MA, USA</i>
Sterilfilter, 0,4 µm	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>

Zentrifugenröhrchen (6 ml, 15 ml, 50 ml)

Falcon, Becton Dickson, Mountain View, CA, USA

2.3 Zellbiologische Arbeiten

2.3.1 Reagenzien

Brefeldin A

Sigma, Deisendorf

Blut ("buffy coat")

Blutbank Universitätskrankenhaus Eppendorf

CD4 Positive Isolation Kit + DetachBead CD4

Dynal, Oslo, Norwegen

CD8 Positive Isolation Kit + DetachBead CD8

Dynal, Oslo, Norwegen

CFSE (5-(und-6)-Carboxyfluorescein-

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Diacetat-Succinimidyl-Ester)

Cohn II (gamma-Globuline)

Sigma, Deisendorf

⁵¹Chrom (250-500 mCi/mg)

Amersham, Buckinghamshire, UK

Fiberglas-Filtermatten

Skatron Instruments, Lier, Norwegen

Ficoll (Dichte 1,077)

Amersham-Pharmacia, Freiburg

Fetales Kälberserum (FCS)

Gibco BRL, Paisley, UK

G418 (Neomycin)

Gibco BRL, Paisley, UK

Gentamycin

Gibco BRL, Paisley, UK

HEPES

Gibco BRL, Paisley, UK

³H-Thymidin (79 mCi/mM)

Amersham, Buckinghamshire

humanes AB-Serum

Blutbank Universitätskrankenhaus Eppendorf

L-Glutamin (200 mM)

Gibco BRL, Paisley, UK

Laufmittel für FACS

Becton Dickson, MountainView, CA, USA

Magnet für die Dynabeads[®]

Dynal, Oslo, Norwegen

(Magnetic Particle Concentrator)

Nylonwolle

Biotest, Dreieich

Pythohämagglutinin (PHA)

Wellcome, Burgwedel

RPMI 1640 ohne L-Glutamin	<i>Gibco BRL, Paisley, UK; PAA, Linz, Österreich</i>
Szinzillationsflüssigkeit für β -Counter	<i>Rotiscint eco, Roth</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Trypanblau (50x)	<i>Serva Feinbiochemica GmbH, Steinheim</i>
Trypsin/EDTA (10x)	<i>Gibco BRL, Paisley, UK</i>

2.3.2 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Das fetale Kälberserum wurde vor dem Gebrauch zur Inaktivierung der Komplementfaktoren für 30 min auf 56°C erhitzt und dann bei 4°C gelagert.

Alle Medien, Puffer etc. für die Verwendung in der Zellkultur wurden entweder aus sterilen Lösungen angesetzt oder durch Autoklavieren sterilisiert.

CFSE-Stammlösung

5 mM in DMSO

Cohn-II-Stammlösung:

10 mg/ml in PBS

10x PBS

2,00 g KCl	(Endkonzentration 26mM)
2,00 g KH ₂ PO ₄	(Endkonzentration 14 mM)
80,00 g NaCl	(Endkonzentration 1,368 M)
14,40 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	(Endkonzentration 81mM)
ad 1 l H ₂ O, pH 7,4	

FACS-PBS

1x PBS + 5% FCS + 0,01 % Natriumazid

FACS-Saponin

1x PBS + 5% FCS + 0,01 % Natriumazid + 0,01% Saponin

Fixier-Lösung für Zellen

2% PFA in 1x PBS

G418-Stammlösung

50 mg/ml

R10F

500 ml RPMI

50 ml FCS (10 %)

10 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM)

7 ml HEPES 1 M (Endkonzentration 2 mM)

500 µl Gentamicin (Endkonzentration 50 µg/ml)

RPMI „serumfrei“

500 ml RPMI

10 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM)

7 ml HEPES 1 M (Endkonzentration 2 mM)

500 µl Gentamicin (Endkonzentration 50 µg/ml)

Vor jedem Versuch wurde zu diesem Medium 10% Humanserum (R10hmn) gegeben, da es sich als besser erwiesen hat, dass humane Serum vor jedem Versuch frisch aufzutauen.

Einfriermedium

95% FCS + 5% DMSO

Trypanblau-Stammlösung

2 mg in 100 ml 1xPBS

Trypsin/EDTA

10x Trypsin/EDTA wurde mit 1xPBS auf 1xTrypsin/EDTA verdünnt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.3.3 Zell-Linien

Tabelle 2.1: Name, Herkunft und Kulturbedingungen der verwendeten Zell-Linien.

NAME	HERKUNFT	KULTURMEDIUM UND -BEDINGUNGEN
SkMel 63 Wildtyp (wt)*	humane Melanomzell-Linie	R10F, 37°C, 5% CO ₂
SkMel 63 B7.1*	humane Melanomzell-Linie, transfiziert mit CD 80 (B7.1), resistent gegen Neomycin (G418)	R10F + G418, 37°C, 5% CO ₂
SkMel 63 B7.2*	humane Melanomzell-Linie, transfiziert mit CD 86 (B7.2), resistent gegen Neomycin (G418)	R10F + G418, 37°C, 5% CO ₂

* die SkMel-Zell-Linien wurden freundlicherweise von Dr. Wolfgang Rudy vom Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

2.3.4 Antikörper

Soweit nicht anders vermerkt richten sich alle Antikörper gegen humane Antigene.

2.3.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.2: Die in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörper.

ANTIGEN	ANTIKÖRPER	ISOTYP	BEZUG
CD3	OKT3	m IgG2a	ATCC
CD3	UCHT1	m IgG1	Dr Beverly
CD4	Mt310	m IgG1	Dako
CD8	B9.11	m IgG1	Dako
CD8	OKT8	m IgG2a	ATCC
CD58	TS2/9	m IgG1	ATCC
CD80 (B7.1)	BNI7	m IgG1	BNI
CD152 CTLA-4	BNI3	m IgG2a	BNI
CD152 CTLA-4	BNI3	m IgG2a	Pharmingen
CD152 CTLA-4	BNI3-biotinyliert	mIgG2a	BNI
CD152 CTLA-4	BNI4	m IgG1	BNI
Mausmyelom*	UPC 10	m IgG2a	Sigma
MHC-I	W6-32	m IgH2a	ATCC
MHC-II	L243	mIgG2a	ATCC

* Isotypkontrolle für den anti-CTLA-4-Antikörper BNI3

2.3.4.2 Direkt-markierte Antikörper

Simultest CD3-FITC/CD19-PE	<i>Becton Dickson</i>
Simultest CD3-FITC/CD16+56PE	<i>Becton Dickson</i>
CD86-PE	<i>Becton Dickson</i>
CD80-FITC	<i>Becton Dickson</i>
CD3-Cy5	die Cy5 markierten Antikörper wurden
CD4-Cy5	freundlicherweise von Dr. Brunner
CD8-Cy5	DRFZ, Berlin zur Verfügung gestellt

2.3.4.3 Markierte Sekundärantikörper und Konjugate

Ziege anti-Maus IgG, FITC-konjugiert, F(ab) ₂ -Fragment, 1 mg/ml	<i>Caltac Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
Ziege anti-human IgG, FITC-konjugiert, F(ab) ₂ -Fragment, 1 mg/ml	<i>Caltac Laboratories, Burlingame, CA, USA</i>
Ziege anti-Maus IgG gekoppelt an Magnetpartikel	<i>Dynabeads[®] M450, Dynal, Skøyen, Norwegen</i>
Streptavidin-Cy5	<i>Molecular Probes, Leiden, Niederlande</i>
Streptavidin-AlexaFluor468	<i>Molecular Probes, Leiden, Niederlande</i>

2.3.5 Fusionsproteine

CTLA-4-Ig	Ein Fusionsmolekül aus dem humanem CTLA-4 und dem Fc-Teil eines human IgG-Antikörpers. Verwendet wurde der Überstand von transfizierten COS-Zellen und aufgereinigtes Protein.
-----------	--

2.4 Biochemische Arbeiten

2.4.1 Reagenzien

Albumin-Standard (BSA)	<i>Pierce, Rockford, IL, USA</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Acrylamid-Bisacrylamid 30%	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	<i>Pierce, Rockford, IL, USA</i>
Kit zur Herstellung der Fab-Fragmente	<i>Pierce, Rockford, IL, USA</i>
Protein-Molekulargewichtsstandard (10 kD-Leiter)	<i>Gibco BRL, Eggenstein</i>
Slide-A-Lyzer 10kDa	<i>Pierce, Rockford, IL, USA</i>
TEMED	<i>BioRAD, München</i>
Trocknungsfolien für Proteingele (Large Cellophane)	<i>Novex, San Diego, CA, USA</i>

2.4.2 Puffer

Phosphat/EDTA-Puffer für die Herstellung der Fab-Fragmente

0,5 M Na_2HPO_4 -Puffer bzw. 0,5 M NaH_2PO_4 werden jeweils auf 20 mM verdünnt und dann solange NaH_2PO_4 in Na_2HPO_4 gegeben bis sich der pH-Wert auf 7,0 eingestellt hat. Zu dieser Lösung wird 0,5 M EDTA gegeben bis eine Endkonzentration von 10 mM EDTA erreicht ist.

2x Beladungspuffer für SDS-Gelelektrophorese

10 ml 2 M Tris
20 ml 20% SDS
20 ml Glycerol
40 ml Aqua. dest.
Bromphenolblau

4x Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris
0,4 M SDS
pH 6,8

4x Trenngel-Puffer

1,5 M Tris
0,4 M SDS
pH 8,8

Ammoniumpersulfat

10% in H₂O

Trenngel (12%) für SDS-Gelelektrophorese

2,5 ml 4x Trenngelpuffer
4,5 ml Aqua. dest.
3,0 ml Polyacrylamid (40%)
100 μ l APS (10%)
12,5 μ l TEMED

Sammelgel (6%) für SDS-Gelelektrophorese

1,25 ml 4x Sammelgelpuffer
3 ml Aqua. dest.
0,6 ml Polyacrylamid (40%)
50 μ l APS (10%)
5 μ l TEMED

10x Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese

250 mM Tris
2,5 M Glycin
1% SDS

Fixierer für Silberfärbung

50% Methanol
12% Eisessig
38% Aqua. dest.

Waschpuffer für Silberfärbung

50% Ethanol

50% Aqua. dest.

Natriumthiosulfatlösung430 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

5 ml Aqua. dest.

Sensibilisierungspuffer für Silberfärbung150 μl Natriumthiosulfatlösung

100 ml Aqua. dest.

Imprägnierungspuffer für Silberfärbung150 mg AgNO_3

75 ml Aqua. dest.

66 μl Formaldehyd 37%

2.5 Laborgeräte

Analysenwaage	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
β-Counter	<i>1205 Betaplate Wallac, Freiburg</i>
CO ₂ -Inkubator	<i>Heraeus Instruments</i>
¹³⁷ Cs-γ-Strahlungsquelle	<i>STS Steuerungstechnik</i>
Zytozentrifuge	<i>Cytospin 3, Shandon GmbH, Frankfurt</i>
Digitalwaage	<i>Kern&Söhne, Albstadt</i>
ELISA-Reader Lambda E	<i>MWG Biotech, Ebersberg</i>
FACScan Flowcytometer	<i>Becton Dickson, MountainView, CA,</i>
FACS Sorter Calibur	<i>USA</i>
CellQuest (V3.3) FACS-Software	<i>Becton Dickson,</i>
	<i>MountainView, CA, USA</i>
Canon EOSD 30 Digitalkamera mit T2- Adaptor für Mikroskop	<i>Canon GmbH, Krefeld</i>
Fluoreszenzmikroskop mit automatischer Kameraanlage	<i>Mikroskop, Axioskop 20 für Auf- lichtfluoreszenz und Mikroskop- Kamera MC 80, Zeiss, Oberkochen</i>
γ-Counter	<i>1282 Compugamma CS, LKB, Wallace</i>
Heizblock	<i>Thermomixer 5436 Eppendorf, Ham- burg</i>
Magnetrührer	<i>Jahnke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen</i>
Mikrowelle	<i>Panasonic</i>
Mikroskop	<i>inverses Mikroskop, CK2 Olympus, Japan</i>
pH-Meter	<i>pH 357 Labortec, Wiesbaden</i>
Pipetten	<i>Gilson Medical Electronics, Frank- reich; Eppendorf, Hamburg</i>
elektrische Pipettierhilfe	<i>Hirschmann</i>
Schüttelinkubator für Bakterienkulturen	<i>Infors, Bottmingen, Schweiz</i>
Spektrophotometer	<i>Modell U-2000, Hitachi, Japan</i>
Sterile Arbeitsbank	<i>Laminair, HB2448, Heraeus</i>

Wasserbad	<i>Thermomix, Braun</i>
Wasserdeionisierungsanlage	<i>Milli-Q-Plus, Millipore, Molsheim, Frankreich</i>
Vortex	<i>Jahnke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen</i>
Zellerntegerät (Microcell Harvester)	<i>Skatron Instruments, Lier, Norwegen</i>
Zentrifugen	<i>Modell 5415C, Eppendorf, Hamburg Biofuge 1.0R, Heraeus-Sepatech Biofuge 1.0, Heraeus-Sepatech Biofuge frisco, Heraeus-Sepatech, Hanau Sigma 3E-1</i>

II METHODEN

2.6 Methoden der Zellkultur

2.6.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen (in RPMI-Medium) wurden in CO₂-Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Labormaterialien aus Kunststoff und Lösungen wurden in feuchter Hitze für 20 Minuten bei 135°C und 2-2,2 bar autoklaviert. Glasgeräte wurden bei 180°C für 3 Stunden sterilisiert. Zur Pelletierung eukaryontischer Zellen wurden diese bei 1200 rpm für fünf Minuten (Megafuge 2.0R) zentrifugiert. Für alle Essays zur Bestimmung der Proliferation wurde Zellkulturmedium mit 10% humanem AB-Serum eingesetzt.

2.6.2 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen können durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff (-196°C) für lange Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wurde ihnen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam Wasser entzogen. Mindestens $5 \cdot 10^6$ Zellen und max. $2 \cdot 10^7$ Zellen wurden auf Eis in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryotubes überführt und auf -70°C abgekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert. Nach dem schnellen Auftauen kryokonserverter Zellen bei 37°C müssen diese mit Kulturmedium gewaschen werden, um das toxische DMSO zu entfernen.

2.6.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zahl der lebendigen Zellen wurde der Trypanausschlußtest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aktiv aus, während tote Zellen blau gefärbt werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

2.6.4 Zell-Linien und ihre Kultivierung

Die adhärent wachsenden Zell-Linien SkMel (wt) und SkMel B7.1 bzw. B7.2 wurden in R10F kultiviert. Das Medium für die transfizierten Zellen SkMel B7.1 bzw. B7.2 enthielt für die Selektion noch G418 (1mg/ml). Wenn die Kulturflaschen von einem dichten Zellrasen bedeckt waren oder sich das Medium gelb färbte, wurden die Zellen mit 1xTrypsin/EDTA abgelöst (5 Minuten, 37°C), zweimal gewaschen und je nach Bedarf 1 : 5 bis 1 : 20 ausverdünn.

2.6.5 Isolierung peripherer Blutlymphozyten

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden aus sogenannten "Buffy Coats" (Erythrozyten-depletierten, separierten Blutkonserven (50 ml) mit einem hohen Leukozytenanteil) durch Dichtezentrifugation gewonnen. Das heparanisierte Blut wurde 1:2 mit 1xPBS verdünnt. 20 ml Ficoll (Dichte 1.077) wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 20 ml Blut/PBS-Lösung überschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation (750 g = 2000 rpm; Megafuge 1.0, Heraeus) ohne eingeschaltete Bremse waren die Lymphozyten in der Interphase zwischen Ficoll und Medium angereichert, während sich die Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrchens befanden. Der Interphasering mit den Lymphozyten wurde entnommen und die Zellen dreimal mit 50 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die PBL in R10hmn aufgenommen und ausgezählt.

2.6.6 Isolierung von T-Zellen aus PBL

Die aus dem Buffy Coat isolierten PBL enthalten neben T-Lymphozyten auch B-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen. Um (fast) reine T-Zellen zu erhalten, ist zuerst die Tatsache von Nutzen, dass Makrophagen und ein kleiner Teil der B-Lymphozyten leicht an Plastik adhären. Jeweils $1 \cdot 10^8$ PBL wurden in einem Volumen von 15 ml in eine große Zellkulturflasche gegeben und für 1,5 - 2 Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden alle nicht-adhären Zellen entnommen und die Kulturflasche mit 5 ml Medium nachgespült. Aus den angereicherten Lymphozyten wurden die T-Zellen dann mit zwei unterschiedlichen Methoden isoliert:

2.6.6.1 Aufreinigung über Schafererythrozyten

Schafererythrozyten (sheep red cell = SRC) können an die CD2-Moleküle von T-Zellen (und auch NK-Zellen) binden und diese so rosettieren. Wegen dieser Tatsache können die T-Zellen von den restlichen PBL abgetrennt werden. Die sterilen SRC wurden mit 1xPBS gewaschen (750 g, 10 min, Megafuge 1.0, Heraeus), bis der Überstand klar und nicht mehr hämolytisch war. Von den gepackten SRC wurden 300 μ l mit 4,6 ml RPMI 1640 und 100 μ l Neuraminidase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Neuraminidase entfernt Neuraminsäure von der Oberfläche der SRC, die sonst zu unspezifischen Bindungen führen könnten. Diese 6%ige SRC-Lösung ist für ca. 4 Wochen bei 4°C haltbar. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die SRC noch einmal mit Medium gewaschen. Je $5 \cdot 10^7$ PBL wurden mit 2,5 ml der 6%igen SRC-Lösung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und für 10 min bei 110 g zentrifugiert. Die Rosettierung erfolgte für eine Stunde auf Eis oder über Nacht im Kühlschrank. Über eine Ficoll-dichtezentrifugation bei 4°C wurden die rosettierten T-Lymphozyten von den anderen Zellen z.B. B-Zellen getrennt. Die Nicht-T-Zellen befanden sich im Interphasering, die rosettierten T-Lymphozyten im Pellet. Der Überstand wurde entfernt und die SRC mit 1 ml destilliertem Wasser lysiert. Nach wenigen Sekunden wurde 10 ml Medium zugesetzt, um eine Lyse der T-Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen, anschließend in R10hmn aufgenommen und ausgezählt.

Die Qualität der Aufreinigung, bestimmt durch den Anteil der CD3- und CD19-positiven Zellen, wurde im FACS untersucht.

2.6.6.2 Aufreinigung über Nylonwolle

Für die meisten Versuche in dieser Arbeit wurde dann aber eine andere Methode verwendet, bei der es zu keiner Ligation von Oberflächenmolekülen z.B. CD2 der T-Zellen kommt. Möglicherweise beeinflusst ein Engagement von CD2, welches durchaus kostimulatorische Eigenschaften hat, die Aktivierung der T-Zellen in dem Proliferationsassay. Deswegen wurden die T-Zellen auf eine Säule mit Nylonwolle gegeben, an der nur B-Zellen und Granulozyten haften bleiben. Hierbei wurde eine mit 1 mg Nylonwolle gefüllte und dann autoklavierte 10 ml Spritze mit 50 ml R10hmn equilibriert und anschließend für mind. 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die über Adhärenz angereicherten Lymphozyten wurden zentrifugiert, in 2 ml R10hmn aufgenommen und auf die Säule gegeben. Nachdem die Zellen in die Nylonwolle eingesickert waren, wurden 500 μ l R10hmn zum Einsickern auf die Säule gegeben und die Säule mit weiteren 4 ml Medium für 45 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit binden nur die B-Zellen und andere APC an die Nylonwolle. Nach der Inkubationszeit wurden die T-Zellen mit insgesamt 14 ml Medium von der Säule eluiert und ausgezählt. Die Qualität der Aufreinigung, gemessen am den Anteil der CD3- und CD19-positiven Zellen, wurde im FACS untersucht.

Bei allen Versuche mit CFSE-markierten T-Zellen wurden die Zellen über Nylonwolle aufgereinigt.

2.6.7 Positive Isolierung von CD4 und CD8 Lymphozyten

Bei einigen Versuchen wurden die T-Zellen in CD4⁺- und CD8⁺-Zellen separiert. Vor dem Ansetzen der Assays wurde dieser Schritt durchgeführt, um beide T-Zellpopulationen getrennt in den Proliferationstests einzusetzen. Die schon aufgereinigten und markierten T-Zellen wurden mit den CD4 und CD8 Positiv Isolation Kits der Firma Dynal isoliert. Zur Durchführung wurden $1,5 \cdot 10^7$ T-Zellen in 3 ml Medium mit 216 μ l anti CD4 beads versetzt, auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und für 20 min bei 4°C rotierend inkubiert. Die rosettierten CD4⁺ T-Zellen wurden über einen Magnetic Particle Concentrator (MPC) isoliert. Der Überstand mit den CD8⁺-T-Zellen wurde mit 216 μ l anti CD8-beads wie oben beschrieben inkubiert und die rosettierten Zellen anschließend isoliert. Die rosettierten Zellen wurden viermal mit Medium gewaschen und in je 100 μ l Medium resuspendiert. Je 100 μ l wurden 10 μ l DETACHaBEAD-Antikörpern für CD4 bzw. CD8 beads hinzugefügt und rotierend bei RT für 60 min inkubiert. Über den MPC wurden die beads abgetrennt und die isolierten Zellen durch Zentrifugation von den freien Antikörpern getrennt. Die isolierten CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen und ausgezählt. Die Reinheit der Zellen wurde mit anti CD4-Cy5 und CD8-Cy5-Antikörpern überprüft (siehe Abb. 3.1.8.1).

2.6.8 Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (CFDA-SE)

CFDA-SE (5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester), meist kurz als CFSE bezeichnet, ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher aufgrund seiner lipophilen Beschaffenheit in Zellen diffundieren kann. Dort wird der farb- und fluoreszenzlose Farbstoff durch zelluläre Esterasen derart gespalten, dass er in eine starkfluoreszierende und aminoreaktive Form übergeht und an Amine in zellulären Proteinen irreversibel bindet. Bei der Zellteilung wird jeweils die Hälfte des Farbstoffes an die Tochterzellen weitergegeben. Durch die Halbierung der Fluoreszenz lässt sich die Proliferation von Zellen bis zur ca. neunten Generation im FACS verfolgen. In dieser Arbeit wurden T-Zellen mit CFSE markiert. Dazu wurden die T-Zellen auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt und nach Zugabe von $1 \mu\text{l}$ CFSE-Stammlösung pro 1 ml Zellsuspension für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem CFSE folgten anschließend drei Waschschrte mit jeweils 15 ml kaltem R10hmn, nach denen die T-Zellen in R10hmn aufgenommen wurden.

2.6.9 Allogene Stimulation der T-Zellen

In dieser Arbeit sollte die Proliferation von T-Zellen gemessen werden, die durch eine allogene Reaktion, d.h. gegen einen anderen MHC-Typ gerichtete Reaktion zur Proliferation angeregt wurden. Als Stimulatorzellen dienten die SkMel-Zell-Linien, die vor der Verwendung in den Tests mit 30 Gy bestrahlt wurden, um eine Proliferation und damit ^3H -Thymidin-Einbau von diesen Zellen zu verhindern. Die Analyse der Proliferation erfolgte entweder durch den Einbau von ^3H -Thymidin oder mittels CFSE-markierter T-Zellen.

Protokoll der Durchführung:

Die Stimulatorzellen wurden mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst, zweimal gewaschen (siehe 2.7.4) und anschließend in der γ -Strahlenquelle für 80 min bestrahlt. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen, ausgezählt und in einer Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen je Vertiefung in einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Flachboden) eingesetzt. Die T-Zellen wurden nach ihrer Isolierung und evtl. Markierung ausgezählt und jeweils 10^5 T-Zellen (bzw. CD4^+ oder CD8^+ -Zellen) in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ in die Vertiefungen gegeben. Wenn dem Test keine weiteren Komponenten wie z.B. Antikörper hinzugefügt wurden, wurden die Vertiefungen mit $50 \mu\text{l}$ Medium (R10hmn) auf $200 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Um die Ergebnisse besser einschätzen zu können, wurden von jedem Testansatz Dreierwerte pipettiert. In einem durchschnittlichen Test wurden folgende Kontrollen eingesetzt:

Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit dem Mitogen PHA ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert, um zu sehen, ob die Zellen prinzipiell in der Lage waren, zu proliferieren. Bei PHA handelt es sich um ein pflanzliches Lektin, welches alle Zellen mit TCR in Anwesenheit von APC unspezifisch stimuliert. Da die maximale Aktivierung bei der Stimulation mit PHA nach 48 h erreicht wird und ein Teil der Zellen anschließend durch den Aktivierungsinduzierten-Zelltod stirbt, ist die Menge an eingebautem ^3H -Thymidin nach 7 Tagen nicht mehr die maximale erreichbare Stimulation. Hinzu kommt, dass eine optimale Stimulation

nur von T-Zellen nur zusammen mit natürlichen APC erreicht wird, die aufgereinigten T-Zellen aber nur noch sehr wenige APC enthalten (siehe Abb. 3.1.2.1).

Als Negativkontrollen wurden die T-Zellen nur mit Medium ohne externe Stimulation und die bestrahlten SkMel ohne T-Zellen inkubiert, um die Eigenproliferation im Medium zu bestimmen.

Antikörper bzw. Fab-Fragmente, die in den Versuchen verwendet wurden, wurden, soweit nicht anders vermerkt, in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Kulturplatten wurden für sieben Tage bei 37°C inkubiert. Wurde die Proliferation durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt, wurden 18 Stunden vor Ende des Versuchen je $20 \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin in jede Vertiefung gegeben.

Entfernen des Zellkultur-Überstandes (3.8)

Um festzustellen, wann CTLA-4 wirkt, wurde der Fab-Fragment-haltige Überstand nach verschiedenen Zeitabständen entfernt und durch normales Medium (R10hmn) ersetzt. Die Überstände wurden mit zwei verschiedene Methoden entfernt. Zum einen wurde die Überstände vollständig mit einer Pipette entfernt und dann die Vertiefungen mit $200 \mu\text{l}$ frischen Medium aufgefüllt. Zum anderen wurden die Zellen zuerst resuspendiert, zentrifugiert, dann der Überstand entfernt und anschließend neues Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden dann wieder auf die Vertiefungen der Zellkulturplatte verteilt.

Versuche zur Überwindung der Anergie (3.12)

Die T-Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert und je $1 \cdot 10^5$ für sieben Tage mit je $5 \cdot 10^4$ SkMel wt inkubiert oder ohne SkMel-Stimulation d.h. nur mit Medium inkubiert. Die T-Zellen wurden anschließend resuspendiert, zentrifugiert und in frischen Medium aufgenommen. Je $1 \cdot 10^5$ T-Zellen aus beiden Ansätzen (SkMel wt und Medium) wurden dann mit jeweils $5 \cdot 10^4$ SkMel wt oder B7.2 (re)stimuliert und entweder nur Medium hinzugegeben oder CTLA-4 durch $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CTLA-4-Fab-Fragment geblockt. Die Zellen wurden für weitere sieben Tage inkubiert und die Proliferation durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt.

2.6.10 Messung der Zellproliferation durch den Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin

Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass eine proliferierende Zelle neue DNA synthetisieren muss. Man stellt der Zelle mit dem radioaktiven Thymidin (^3H -Thymidin) einen Baustein der DNA als radioaktiv markierte Substanz zur Verfügung. Der Einbau des ^3H -Thymidin lässt sich messen, und man bekommt einen relativen Wert für die Proliferation der untersuchten Zellen. Je höher die gemessene Radioaktivität, um so höher ist die Thymidin-Einbaurate und damit die Proliferation der Zellen.

Für die Analyse der Proliferation wurden die Zellen mit einem automatischen Zellerntegerät aus den Vertiefungen entnommen, wobei die Zellen mit dest. Wasser lysiert und durch einen Glasfaserfilter gesaugt wurden. Die DNA wird dabei in dem Filter zurückgehalten. Der Filter wurde in einer Mikrowelle getrocknet und danach in eine Plastikhülle geschweißt. Da es nicht möglich ist, β -Strahlung direkt zu messen, wurde der Filter mit 10 ml

Szintillationsflüssigkeit getränkt, die die β -Strahlung in Lichtblitze umwandelte und es ermöglichte, die Radioaktivität dann in einem β -Szintillationszähler zu bestimmen. Die Radioaktivität wurde in Zerfällen pro Minute (counts per minute) angegeben.

2.6.11 Messung der Zellproliferation mittels CFSE-markierter T-Zellen

Da CFSE sehr lange stabil in der Zelle verbleibt und bei einer Zellteilung jeweils die Hälfte an Tochterzellen weitergegeben wird, kann man im FACS bestimmen, wann sich wieviel Zellen teilen. Die Proliferationsassays mit CFSE-markierten T-Zellen bzw. separierten $CD4^+$ und $CD8^+$ -Zellen wurden genauso angesetzt, wie die Tests für eine Auswertung durch 3H -Thymidineinbau (2.6.9), nur wurden hier nicht unbedingt Dreierwerte pipettiert sondern die Anzahl von der Menge der unterschiedlichen FACS-Messungen bestimmt. Für eine FACS-Messung wurden mindestens 1,5 Vertiefungen benötigt, was ca. $1,5 \cdot 10^5$ T-Zellen entspricht, sollten sich die T-Zellen nicht geteilt haben. Die Zellen wurden, soweit nicht anders vermerkt, für sieben Tage bei $37^\circ C$ inkubiert.

Für die Auswertung wurden die Zellen aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatten entnommen und gleiche Testansätze wurden in einem oder mehreren FACS-Röhrchen vereinigt, je nachdem, wieviel verschiedene FACS-Färbungen durchgeführt wurden. Die Zellen wurden gewaschen und für die FACS-Analyse gefärbt (s.u.).

2.6.12 Durchflusszytometrie (FACS)

2.6.12.1 Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)

Um die Expression von Oberflächenmolekülen zu quantifizieren oder die Anteile von positiven Zellen zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Messungen (FACS, Fluorescence activated cell sorter) durchgeführt.

Je Färbung wurden zwischen $2 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert und abzentrifugiert. Die F_c -Rezeptoren der Zellen wurden mit $20 \mu l$ Cohn-II ($20 \mu g/ml$) auf Eis für 15 Minuten blockiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. $1 \mu l$ des primären Antikörpers wurde in $50 \mu l$ FACS-Puffer zugegeben und für 30 Minuten auf Eis oder $4^\circ C$ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper ($1 \mu l$ in $50 \mu l$ FACS-Puffer) zugegeben und 30-60 Minuten auf Eis oder bei $4^\circ C$ im Dunkeln inkubiert. Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung des Fluoreszenz-konjugierten Sekundär-Antikörpers beurteilen zu können, wurde stets eine Negativkontrolle ohne Primär-Antikörper durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in $250 \mu l$ FACS-PBS aufgenommen und im FACS gemessen. Bei Verwendung direkt markierter Antikörper wurde nach der ersten Inkubation dreimal gewaschen und die Zellen dann für die Messung in FACS-PBS aufgenommen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACScan oder FACS-Calibur Flow Cytometer) unter Verwendung der dazugehörigen Software (CellQuest, Becton Dickinson, Heidelberg).

2.6.12.2 Färbung von intrazellulären Molekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)

Um intrazelluläre Zytokine in T-Zellen zu quantifizieren, wurde die Ausschüttung der Zytokine durch Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A 4 Stunden vor Ende des Stimulationsassays gehemmt. Die T-Zellen wurden abgenommen und eine normale Färbung der Oberflächmoleküle durchgeführt. Nach dem Waschen der Zellen wurden sie in 1 ml 2% PFA in PBS zum Fixieren aufgenommen. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde dreimal gewaschen und die T-Zellen in 50 μl Saponin-Puffer aufgenommen. Das Saponin permeabilisiert die Zellen, sodass die Antikörper in die Zelle eindringen können. Alle nachfolgenden Färbe- und Waschschrte wurden deshalb mit FACS-Saponin-Puffer durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen erst 15 min mit Cohn II und dann mit 1 μl anti-IFN- γ -bio bzw. anti IL-4-bio in 50 μl FACS-Saponin-Puffer für ca. 45 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Saponin-Puffer wurden die Zellen mit Streptavidin-Cy5 (1/100) oder AlexFlour488 (1/200) gefärbt. Nach 30 Minuten wurden die Zellen dreimal mit FACS-Saponin-Puffer gewaschen, in 250 μl FACS-Puffer aufgenommen und im FACS ausgewertet.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Herstellung von Fab-Fragmenten

Die Fab-Fragmente aus dem BNI3-Antikörper und dem Kontrollantikörper UPC 10 wurden mit dem Immuno Pure Fab-Purification Kit der Firma Pierce hergestellt. Die Durchführung erfolgte wie im Protokoll des Herstellers beschrieben.

Zuerst wurde der gereinigte Antikörper gegen einen Phosphat/EDTA-Puffer dialysiert, auf ca. 0,5 ml eingengt anschließend 1 : 1 mit einem frisch-hergestellten Cystein-Puffer gemischt und zu der Papain/Agarose-Suspension gegeben. Papain spaltet den Antikörper in die antigenbindenden Fab-Fragmente und den Fc-Teil. Das Papain ist dabei kovalent an Agarosepartikel gebunden, um eine Abtrennung der verdauten Antikörper von dem Papain zu erleichtern. Abweichend vom Protokoll wurde dieser Schritt nicht in Glasreagenzröhrchen durchgeführt, sondern in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Thermomixer, da sich sonst die Agarosepartikel absetzten und der Verdau nicht vollständig wäre. Der Rohextrakt des Verdaus wurde durch ein Filter von den Agarosepartikel getrennt und die Fab-Fragmente von dem Fc-Teil und unverdaulichem Antikörper in einer Protein-G-Säule isoliert. Die Protein-G-Säule bindet nur das Fc-Fragment und den kompletten Antikörper, sodass die Fab-Fragmente im Eluat aufgefangen werden können. Die Fc-Fragmente wurden anschließend mit einem speziellen Puffer durch Änderung der Salzkonzentration eluiert und ebenfalls aufbewahrt. Der Erfolg des Verdaus wurde in einer SDS-PAGE überprüft, das Gel anschließend Silber- oder Coomassie-gefärbt und die Fab-Fragmente letztendlich gegen RPMI dialysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden sie zum Schluss sterilfiltriert (Filterdurchmesser 0,22 μm).

Ein Teil der Fab-Fragment dieser Arbeit wurden durch die Firma Biometec, Greifswald hergestellt. Die Herstellung erfolgte ebenfalls mit dem Immuno Pure Fab-Purification Kit der Firma Pierce und nach deren Protokoll. Die Qualität der Fab-Fragmente wurde über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt. Abb. 2.1.1 zeigt die Silberfärbung einer Probe der Fab-Fragmente, die durch die Firma BIOMETEC hergestellt wurden. Es ist zu erkennen, dass es sich um eine sehr saubere Präparation handelt, da außer dem Fab-Fragment keine weiteren Banden sichtbar sind. Genauso sauber sind auch die selber hergestellten Präparationen der Antikörper BNI3 und UPC10, die in Abb. 2.1.2 zusehen sind. Hierbei handelt es sich um eine 12%iges SDS-Gel, bei dem die Proteine anschließend mit Coomassie gefärbt wurden.



Abb. 2.1.1 Überprüfung der Qualität der BNI3 Fab-Fragment hergestellt durch die Firma BIOMETEC in der SDS-PAGE. 5 μ l der Fab-Fragmente wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

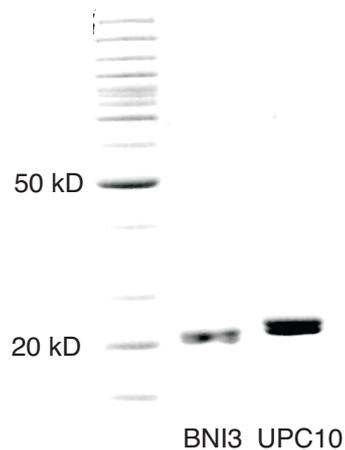


Abb. 2.1.2 Überprüfung der Qualität der BNI3 und UPC10 Fab-Fragmente in der SDS-PAGE. 10 μ l der Fab-Fragmente des anti-CTLA-4-Fab-Fragmentes BNI3 bzw. des Kontroll-Fab-Fragmentes UPC10 wurden auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

2.7.2 Umpufferung und Proteinkonzentration

Zur Dialyse von Flüssigkeitsmengen zwischen 0,5 und 3 ml wurde das Slide-A-Lyzer[®] System der Firma Pierce verwendet. Die Be- und Entladung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Dialyse erfolgte durch drei- bis viermaligen Austausch des Puffers (300 ml) nach jeweils mind. vier Stunden.

Um den Puffer sehr schnell, aber eventuell nicht so gründlich auszutauschen, wurden die Centricon-Säulen von Amicon verwendet. Die Säulen wurde den Herstellerangaben entsprechend gehandhabt.

Sollten Antikörper oder Fab-Fragmente in Lösung hochkonzentriert werden, wurde das Protein in Centricon 10-Filterssäulen gegeben und bei 4000 rpm und 4°C (Megafuge 1.3R, Heraeus) so lange zentrifugiert, bis die Lösung auf das gewünschte Volumen eingengt war. Die Centricon 10 Filter halten Proteine, die größer als 10 kD sind, zurück.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen zwischen 2 mg und 50 µg/ml wurden in einer 96-Vertiefungen-Flachbodenplatte 20 µl der zu messenden Probe gegeben und mit 250 µl Coomassie-Reagenz gemischt. Das Reagenz bildet mit Proteinen der Probe einen blauen Farbstoff. Bei 630 nm wurde die optische Dichte in einem ELISA-Reader bestimmt. Für die Bestimmung von geringen Proteinkonzentrationen von 100 µg/ml bis ca. 1 µg/ml wurden je 100 µl Probe und 100 µl Coomassie-Reagenz verwendet. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer BSA-Standardkurve errechnet.

2.7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Das denaturierende Reagenz Natriumdodecyl-Sulfat (SDS) hebt die dreidimensionale Struktur der Proteine auf und „maskiert“ durch seine starke negative Ladung ihre Eigenladung, sodass die Wanderung der Proteine von Anode zur Kathode erfolgt und die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von der Form und Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann. Es wurden 7,5 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Proben wurden mit 5x Beladungspuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und nach dem Abzentrifugieren auf das SDS-Gel geladen. Für die Silberfärbung wurde 1 µl 10 kD-Leiter-Proteinmarker eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V und 30 mA/Gel für ca. eine Stunde.

2.7.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sensitive Färbemethode, mit der sich Proteinmengen ab 50 pg in Polyacrylamidgelen nachweisen lassen. Im Rahmen der Arbeit wurde sie verwendet, um die Reinheit von eigenen und von der Firma Biometec hergestellten Fab-Fragment-

Präparationen zu bestimmen. Dazu wurde das Polyacrylamidgel nach der SDS-PAGE (2.7.4) über Nacht fixiert und dann dreimal für mindestens 30 Minuten in 50%igem Ethanol gewaschen und anschließend eine Minute in Sensibilisierungspuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 20 Sekunden in ddH₂O wurde das Gel 20 Minuten in Imprägnierungspuffer gelegt. Nach drei Waschschritten für je 20 Sekunden in ddH₂O wurde das Gel in Entwickler inkubiert, bis die Markerbanden in ausreichender Stärke erkennbar waren. Anschließend wurde das Gel mehrfach mit ddH₂O gewaschen und bis zum Trocknen in Fixierer bei 4°C gelagert. Vor dem abschließenden Trocknen zwischen zwei Seiten Cellophan, wurde das Gel für mindestens eine Stunde in dest. Wasser gelegt.

2.7.6 Coomassiefärbung

Durch eine Coomassiefärbung lassen sich Proteine zwar nicht so sensitiv anfärben, wie durch eine Silberfärbung, doch ist die Durchführung einfacher und nicht so zeitaufwendig. Das Gel wird in die Coomassie-Färbelösung gelegt und bei Raumtemperatur für etwa eine Stunde geschüttelt. Dabei bindet der Triphenylmethanfarbstoff relativ unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Die Proteine werden gleichzeitig durch Essigsäure im Gel fixiert. Nicht an Protein gebundener Farbstoff wird durch wiederholtes Spülen mit ddH₂O ausgewaschen, bis das Gel ausreichend entfärbt ist. Das Gel wird abschließend, wie unter 2.7.5 beschrieben, getrocknet.

3. Ergebnisse

Der Ergebnissteil gliedert sich in zwei Abschnitte. Der erste Abschnitt zeigt die Ergebnisse der Versuche zur verstärkten Aktivierung humaner T-Zellen durch die Fab-Fragmente eines Antikörpers gegen humanes CTLA-4. Der zweite Abschnitt zeigt, dass es auch bei humanen T-Zellen einen Schwellenwert für die Aktivierung gibt, nach dessen Erreichen die Zellen unabhängig von weiterer Kostimulation eine Reihe von Zellzyklen durchlaufen.

3.1 Blockade von CTLA-4 bei einer allogenen Immunantwort

3.1.1 Die SkMel Zellen sind mit B7.2 transfiziert

Die adhärenzte Haut-Melanomzell-Linie SkMel 63 ist in den Versuchen dieser Arbeit als künstliche APC eingesetzt worden, um T-Zellen zu stimulieren. Die T-Zellen erkennen dabei die allogegenen MHC I und II Moleküle auf der Oberfläche der SkMel-Zellen. Die nichttransfizierte Wildtypform SkMel wt ist aufgrund fehlender kostimulatorischer Moleküle nicht in der Lage, naive T-Zellen vollständig zu aktivieren. Für die vollständige Aktivierung der naiven T-Zellen wurden mit dem kostimulatorischen Moleküle CD86 (B7.2) stabil transfizierte SkMel-Zellen verwendet. Abb. 3.1.1 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der SkMel-Zellen auf die Expression von CD86. Die Expression von CD86 wurde regelmäßig untersucht um sicherzustellen, dass die SkMel B7.2 tatsächlich B7.2 exprimieren und um auszuschließen, dass die Wildtypzellen mit den SkMel B7.2 kontaminiert sind.

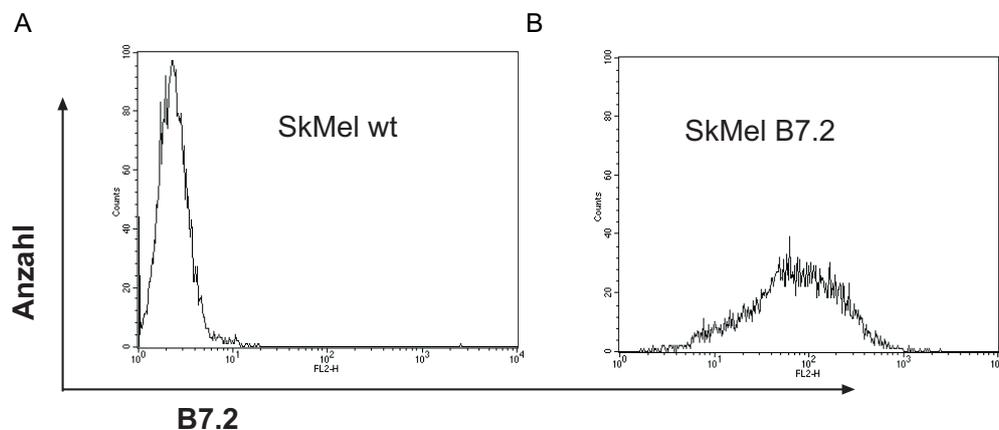


Abb. 3.1.1 Expression von B7.2 auf der Oberfläche der SKMel63 wt (A) und SkMel B7.2 (B) Zell-Linie. Auf der X-Achse ist der dekadische Logarithmus der relativen Fluoreszenzintensität (FL2-H) und auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen (counts) dargestellt. Die Zellen wurden mit einem PE-markierten Antikörper (FL-2) gegen B7.2 (CD86) gefärbt.

Wie deutlich zu sehen ist, exprimieren die SkMel wt keinerlei B7.2 auf ihrer Oberfläche, während praktisch alle SkMel B7.2 Zellen positiv für CD86 sind. Die Expression von CD86 ist nicht statisch, d.h. auch eine Selektion von SkMel B7.2, die besonders viel CD86 exprimieren führt, nach kurzer Zeit wieder zu Verteilung der Expression, wie sie Abb. 3.1.1B zeigt. Desweiteren exprimieren 100% der SkMel-Zellen MHC I und MHC II (Daten nicht gezeigt). Dieses ist insofern wichtig, da ohne eine Expression der MHC-Moleküle die T-Zellen auch keinen allogegenen Stimulus erhalten würden.

3.1.2 Gereinigte PBL enthalten fast keine APC mehr

Für die Stimulationsversuche wurden gereinigte humane T-Zellen eingesetzt. Diese wurden aus den PBL isoliert, um den Anteil an Makrophagen und B-Zellen so gering wie möglich zu halten. Diese professionellen APC wären in der Lage, Antigen auch von nichttransfizierten SkMel wt zu präsentieren und damit die T-Zellen zu aktivieren. Es ist aber wichtig, dass die T-Zellen auf den SkMel wt nicht proliferieren, da dies die Negativkontrolle für die Stimulationstests ist.

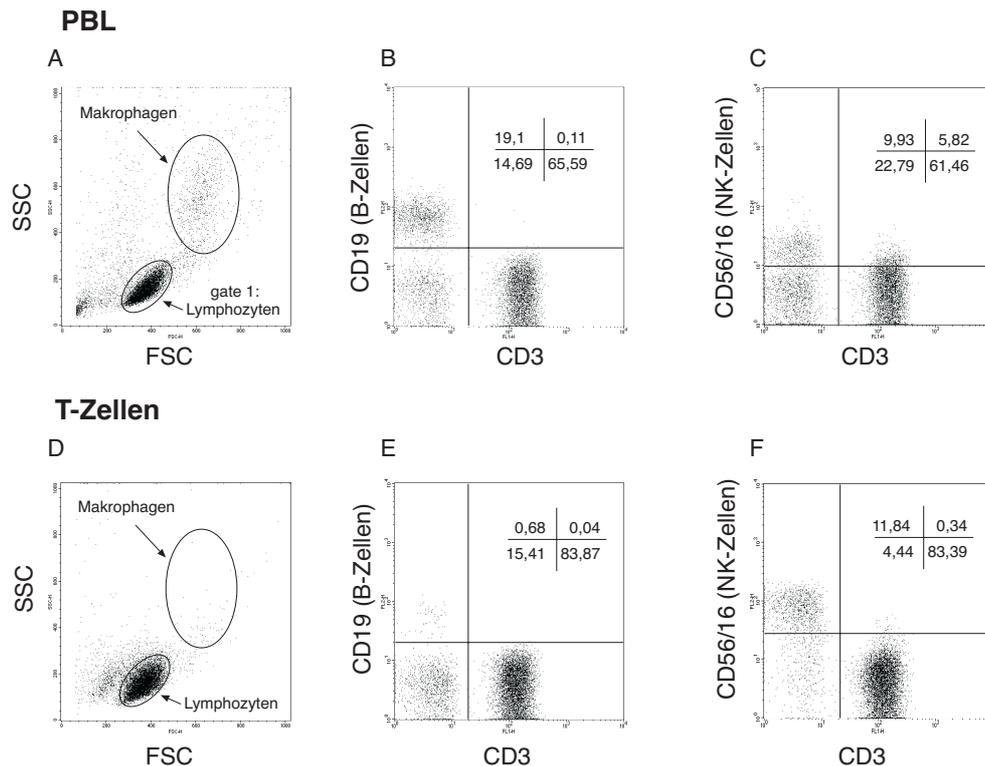


Abb. 3.1.2.1 Durchflusszytometrische Untersuchung der PBL und daraus isolierten T-Zellen auf die Verteilung von CD3, CD19 und CD56/CD16 positiven Zellen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der entsprechend gefärbten Zellen in dem Quadranten an. Für die Auswertung wurde nur die lebenden Lymphozyten verwendet (gate1 Abb. D). Die Zellen wurde mit einer Kombination aus CD3-FITC und CD19-PE bzw. CD16/56-PE gefärbt.

Die T-Zellen für die Versuche wurden aus „Buffy Coats“ aufgereinigt. Nach der Isolation der T-Zellen wurde die Reinheit der Zellen regelmäßig im FACS untersucht (Abb. 3.1.2.1). Im Vergleich der Zellen vor (PBL) und nach der Aufreinigung (T-Zellen) zeigte sich in Abb. 3.1.2.1a und c, dass die Population der Makrophagen und Granulozyten fast vollständig verschwand. Die statistische Auswertung der Lymphozytenpopulation (gate1) in Abb. 3.1.2.1 a und d) ergab, dass die aufgereinigten T-Zellen nur noch einen verschwindend geringen Teil an B-Zellen (< 1%) und Makrophagen enthielten, die als APC dienen könnten. Weiter zeigte sich, dass die aufgereinigten Zellen zu ca. 85% aus CD3 positiven T-Zellen bestanden. Bei den restlichen 13% der Zellen handelte es sich größtenteils um NK-Zellen wie Abb. 3.1.2.1 F zeigt. Der Anteil der NK-Zellen schwankte je nach Spender zwischen 5 und 20%.

3.1.3 Das Fab-Fragment des anti-CTLA-4-Ak BNI3 bindet an humanes CTLA-4

In Versuchen, die dieser Arbeit voraus gingen, wurde bereits gezeigt, dass der Gesamtantikörper BNI3 an humanes CTLA-4 bindet (Castan et al., 1997). Um zu zeigen, dass auch das Fab-Fragment des anti-CTLA-4-Antikörpers BNI3 an CTLA-4 bindet, wurde das Fab-Fragment mit CTLA-4-Ig vorinkubiert und anschließend die SkMel B7.2 mit diesem Komplex gefärbt. Das humane CTLA-4-Ig bindet nur an B7.2 transfizierte SkMel und nicht an die Wildtypzellen. Die Bindung von CTLA-4-Ig an die transfizierten Melanomzellen ist keine unspezifische Interaktion, sondern eine spezifische Bindung an B7.2 und lässt sich durch Antikörper und Fab-Fragmente gegen CTLA-4 verhindern (ohne Abb.). Wie in Abb. 3.1.3.1 zu gezeigt wird, ist das Fab-Fragment in der Lage an CTLA-4 zu binden, da es die Bindung von CTLA-4-Ig an CD86 vollständig blockieren kann.

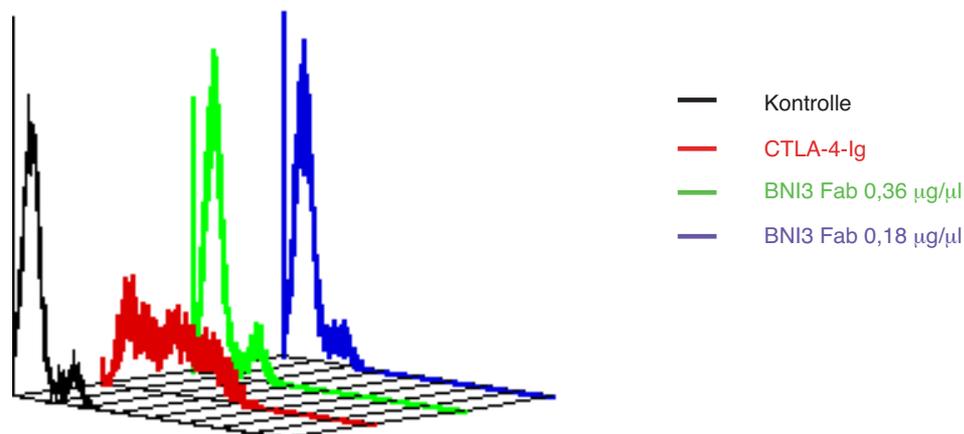


Abb. 3.1.3.1 Das BNI3 Fab-Fragment bindet an humanes CTLA-4 und blockiert so die Bindung von CTLA-4-Ig an SkMel B7.2. $5 \cdot 10^5$ SkMel B7.2 wurden mit CTLA-4-Ig inkubiert und anschließend mit anti-human IgG-FITC gefärbt. In rot ist die eine solche Färbung mit halbmaximaler CTLA-4-Ig Konzentration dargestellt. Diese Bindung wurde durch eine Vorinkubation des CTLA-4-Ig mit $10 \mu\text{g/ml}$ Fab-Fragment (grün und blau) blockiert. Es handelt sich dabei um zwei unterschiedliche Präparationen des anti-CTLA-4 Fab-Fragmentes.

Durch hier nicht gezeigte Vorversuche wurde eine CTLA4-Ig Konzentration gewählt, die nur noch ca. 50 % der SkMel B7.2 färbt. Dadurch ist bei den eigentlichen Blockadeversuchen gewährleistet, dass CTLA-4-Ig nicht im Überschuss vorliegt und auch nach der Bindung an die anti-CTLA-4 Fab-Fragmente noch genügend CTLA-4-Ig im Überstand vorhanden wäre, um die SkMel B7.2 zu färben. Die Blockade-Experimente wurden mit allen Chargen des BNI3-Fab-Fragmentes durchgeführt, um die Qualität der Fab-Fragment zu überprüfen. Es zeigte sich keine Unterschied in der Fähigkeit, die Bindung von CTLA-4-Ig an CD86 zu blockieren.

3.1.4 B7.2 transfizierte SkMel aktivieren T-Zellen

Es konnte von W. Rudy und U. Moebius vom DKFZ (Heidelberg) gezeigt werden, dass die B7-transfizierten SkMel-Zellen prinzipiell in der Lage sind, T-Zellen zur Proliferation anzuregen (W. Rudy et al 1997). Abb. 3.1.4.1 und 3.1.4.2 zeigen, dass die Ergebnisse in modifizierter Form reproduziert werden konnten. Die T-Zellen ohne Stimulus zeigten praktisch keine Proliferation, gleiches galt für die bestrahlten SkMel wt und SkMel B7.2, die als Negativkontrolle ohne T-Zellen inkubiert wurden. Bei den T-Zellen, die durch die SkMel wt aktiviert wurden, war eine leichte Proliferation zu sehen, obwohl praktisch keine Kostimulation in Form von B7 vorhanden war. Diese Proliferation war aber im Vergleich zu der Proliferation, die bei der Stimulation mit B7.2 erreicht wurde, sehr gering. Ein Proliferationsrate, bei der eine Stimulation mit B7.2 mindestens zehnmal höhere Werte erreicht, als bei der Stimulation mit den nichttransfizierten Wildtyp-Zellen, ließ sich mindestens zehnmal wiederholen (siehe aber auch 3.1.5). Die Proliferation der T-Zellen ließ sich bei entsprechender Aktivierung auch mikroskopisch beobachten (Abb. 3.1.4.1). Nach einer Aktivierung der T-Zellen durch die SkMel B7.2 bilden diese Cluster von proliferierenden Zellen und es sind praktisch alle Stimulatorzellen zerstört worden (Abb. 3.1.4.1.1). Im Gegensatz dazu sieht man in Abb. 3.1.4.1.2 nach einer Stimulation mit SkMel wt einen dichten Zellrasen der intakten adhärennten Stimulatorzellen, auf denen die runden, nicht aktivierten T-Zellen liegen.

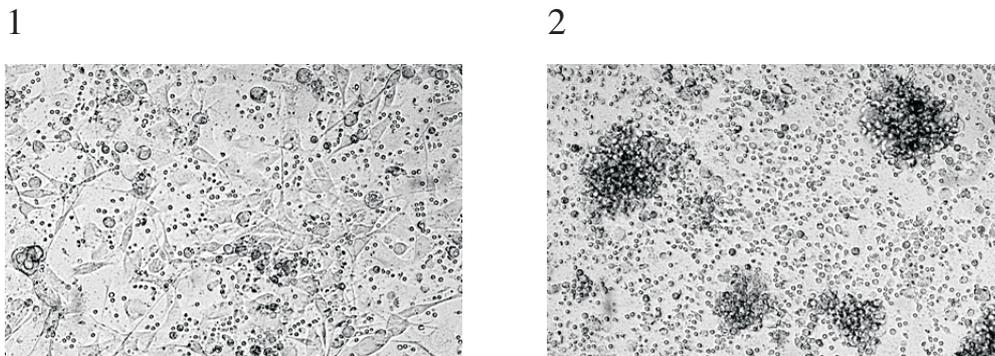


Abb. 3.1.4.1 Mit SkMel wt und SkMel B7.2 aktivierte T-Zellen lassen sich im Mikroskop unterscheiden. Je $1 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden mit $5 \cdot 10^4$ SkMel wt (1) oder B7.2 (2) für sechs Tage inkubiert. (Durchlicht, Vergrößerung: 32x)

Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass eine optimale Stimulation bei dem Einsatz von Zellkulturschalen mit Flachboden, humanem statt Kälberserum und einer geringen Zahl von Stimulatorzellen erreicht wird. Der Einsatz von Zellkulturschalen mit Flachboden begünstigt, dass die adhärennten SkMel ein Monolayer am Boden der Vertiefung bilden und ein optimaler Kontakt mit den T-Zellen hergestellt wird. Die Verwendung von FCS wäre zwar kostengünstiger, aber einige Bestandteile des FCS aktivieren T-Zellen unspezifisch (ohne Abb.), sodass für alle Versuche humanes AB-Serum eingesetzt wurde. In Abb. 3.1.4.3 ist dargestellt, wie eine zu hohe Dichte an Stimulatorzellen eine Aktivierung der T-Zellen unterdrückt. Eigentlich sollte die Dichte der SkMel recht hoch sein, sodass sich ein

Monolayer ohne Lücken bildet und jede T-Zelle potentiell Kontakt zu einer APC bekommt. Die Bestrahlung der SkMel verhinderte aber nur die weitere Zellteilung der Zellen, blockierte aber nicht deren Stoffwechsel. Wurden nun zu viele SkMel eingesetzt, verbrauchten diese zuviel Nährstoffe, die den T-Zellen dann nicht mehr zu Verfügung standen. Im Gegensatz dazu verhinderte auch eine zu geringe Dichte der SkMel eine ausreichende Aktivierung. Von diesen Ergebnissen ausgehend, wurden für alle Stimulationsversuche $5 \cdot 10^4$ SkMel wt bzw. SkMel B7.2 je Vertiefung eingesetzt. Für die T-Zellen hatte sich eine Menge von $1 \cdot 10^5$ Zellen je Vertiefung als ideal erwiesen.

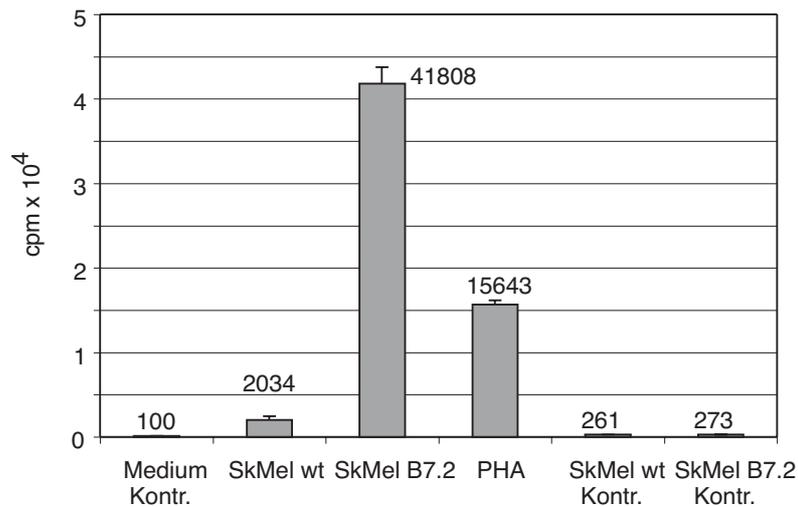


Abb. 3.1.4.2: T-Zellen werden vom B7.2 transfizierten SkMel aktiviert. Spezifische Stimulation durch die transfizierten SkMel B7.2-Zellen im Vergleich zum Wildtyp und der Negativkontrolle. Eingesetzt wurden $5 \cdot 10^4$ SkMel und $1 \cdot 10^5$ T-Zellen je Vertiefung einer Mikrotiter Flachbodenplatte. Das Medium enthielt humanes Serum. „SkMel wt“, und „SkMel 7.2“ stehen für die entsprechende SkMel-Zellen, die als Stimulator verwendet wurden. „PHA“ ist die Positivkontrolle und „Medium Kontr.“ die Negativkontrolle der T-Zellen ohne externe Stimulation. „SkMel wt Kontr.“ bzw. „SkMel B7.2 Kontr.“ sind die Negativkontrollen der bestrahlten SkMel ohne T-Zellen. Die Auswertung erfolgte nach sieben Tagen durch die Messung der eingebauten ³H-Thymidinmenge und ist in cpm angegeben. Versuche mit vergleichbaren Ergebnissen ließen sich mindestens zehnmal wiederholen.

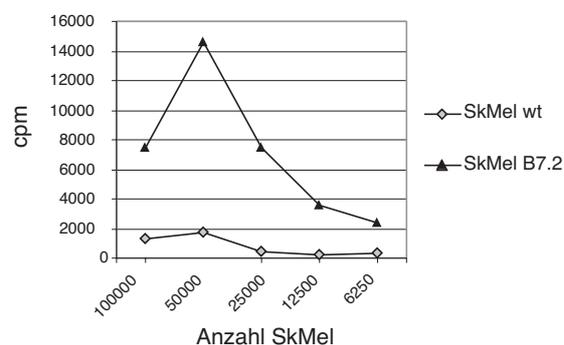


Abb. 3.1.4.3: Eine zu hohe Anzahl an Stimulatorzellen stört die Aktivierung der T-Zellen. Eingesetzt wurden zwischen ca. 6000 und $1 \cdot 10^6$ SkMel und jeweils $1 \cdot 10^5$ T-Zellen je Vertiefung einer Mikrotiter Flachbodenplatte. Das Medium enthielt humanes Serum. „SkMel wt“, und „SkMel 7.2“ stehen für die entsprechende SkMel-Zellen, die als Stimulator verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der eingebauten ³H-Thymidinmenge und ist in cpm angegeben. Gezeigt ist ein typisches Experiment von dreien.

3.1.5. Die T-Zellen ließen sich nicht jedesmal von den SkMel B7.2 aktivieren

Die Ergebnisse in aus 3.1.4 ließen sich zwar prinzipiell jederzeit reproduzieren, doch kam es nicht immer zu dieser Aktivierung der T-Zellen. Obwohl die Zellen genauso behandelt wurden, wie bei erfolgreichen Versuchen und die gleichen Versuchsparmeter verwendet wurden, war es bei einer Reihe von Versuchen nicht möglich, eine Proliferation der T-Zellen zu messen. Dies galt sowohl für die Versuche, bei denen die Proliferation durch ^3H -Thymidineinbau gemessen wurde, als auch bei Versuchen, bei denen die T-Zellen mit CFSE markiert worden waren. In Abb. 3.1.5.1 ist ein solcher Versuch mit CFSE-markierten T-Zellen beispielhaft dargestellt. Bei der Auswertung des ^3H -Thymidineinbaus

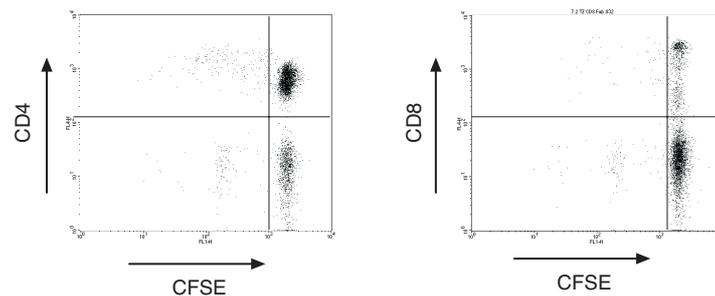


Abb. 3.1.5.1 Keine proliferierenden Zellen nach sieben Tagen Stimulation. T-Zellen wurden mit CFSE markiert und je $1 \cdot 10^5$ T-Zellen mit $5 \cdot 10^4$ SkMel B7.2 für sieben Tage inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit anti CD4-Cy5 oder anti CD8-Cy5 gefärbt und im FACS ausgewertet.

zeigte sich aber durch die hohen Werte der PHA-Kontrolle, dass die T-Zellen im Prinzip stimulierbar waren. In Tab. 3.1 ist zu sehen, dass die cpm bei der Stimulation von T-Zellen mit SkMel B7.2 kaum über den Wert der Negativkontrollen stieg. Auch die Zugabe von anti-CTLA-4 Fab-Fragmenten konnte die Zellen nicht aktivieren.

Tab. 3.1 Keine Aktivierung der T-Zellen durch die SkMel B7.2 nachweisbar. Je $1 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden mit $5 \cdot 10^4$ SkMel B7.2 oder wt für sieben Tage inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der eingebauten ^3H -Thymidinmenge und ist in cpm angegeben. Die linke Spalte zeigt die Kontrollen der T-Zellen ohne SkMel und die Negativkontrollen der bestrahlten Stimulatorzellen ohne T-Zellen.

	cpm		cpm
T-Zellen o. Stimulus	47	SkMel wt + T-Zellen	237
SkMel wt o. T-Zellen	331	SkMel B7.2 + T-Zellen	164
SkMel B7.2 o. T-Zellen	78	SkMel wt + T-Zellen + Fab	201
PHA	45467	SkMel B7.2 + T-Zellen + Fab	222

3.1.6 Fab-Fragmente gegen CTLA-4 verstärken die Proliferation der T-Zellen; kaum Einfluss des Gesamtantikörpers gegen CTLA-4

Die in Abb. 3.1.4 gezeigte B7-abhängige Proliferation der T-Zellen sollte nun durch die Blockade von CTLA-4 weiter verstärkt werden. Zu diesem Zwecke wurde entweder der unmodifizierte monoklonale anti-CTLA-4-Antikörper BNI3 oder das entsprechende Fab-Fragment eingesetzt. Da CTLA-4 nur nach einer Aktivierung auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, sollte eine Blockade des inhibitorischen Signals von CTLA-4 auch nur aktivierte Zellen beeinflussen. Für diese Versuche wurden ebenfalls $5 \cdot 10^4$ SkMel wt bzw. B7.2 mit $1 \cdot 10^5$ T-Zellen für sieben Tage inkubiert. Der Antikörper oder das Fab-Fragment wurden in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. In Abb. 3.1.6.1 ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt, bei dem der Gesamtantikörper und das Fab-Fragment im direkten Vergleich eingesetzt wurden. Es ist deutlich zu sehen, dass eine Blockade des CTLA-4 durch das Fab-Fragment die Aktivierung nach einer Stimulation durch SkMel B7.2 noch weiter verstärken konnte (dunkelgraue Balken) und zu einer Verdoppelung der Proliferation führte. Im Gegensatz dazu konnte der Gesamtantikörper die Proliferation nicht verstärken, sondern inhibierte die Proliferation in diesem Experiment sogar leicht. Da der Gesamtantikörper in weiteren Experimenten sehr variable Resultate zeigte, indem er manchmal leicht inhibierend in anderen Versuchen wieder leicht aktivierend wirkte, wurden die folgenden Versuche nur mit dem korrespondierenden Fab-Fragment durchgeführt.

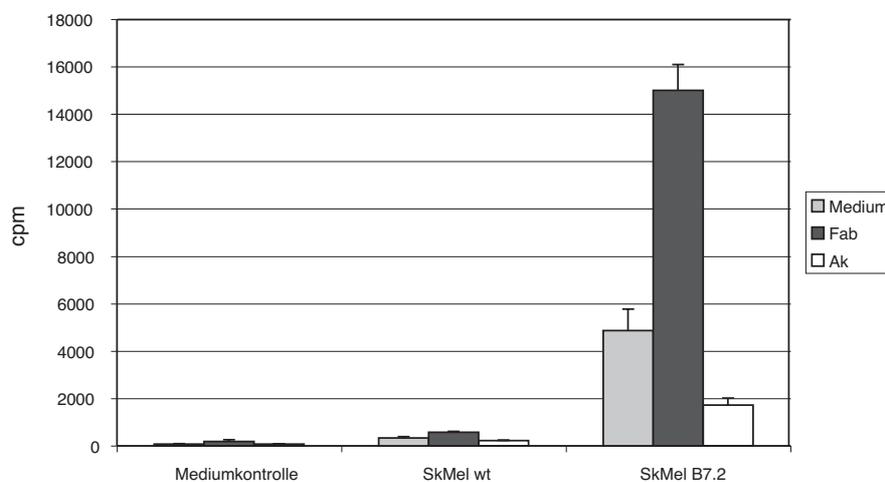


Abb. 3.1.6.1 Fab-Fragmente gegen CTLA-4 verstärken die Proliferation der T-Zellen; kaum Einfluss des gesamt Antikörper gegen CTLA-4. Eingesetzt wurden $5 \cdot 10^4$ SkMel und $1 \cdot 10^5$ T-Zellen je Vertiefung einer Mikrotiter Flachbodenplatte. Das Medium enthielt humanes Serum. „SkMel wt“, und „SkMel 7.2“ stehen für die entsprechende SkMel-Zellen, die als Stimulator verwendet wurden.

Ein leichter Anstieg der Proliferation, verursacht durch die Blockade von CTLA-4, ist auch bei der Verwendung von SkMel wt als Stimulatorzellen zu sehen. Wie in Abb. 3.1.6.1.1 zu sehen ist, wurden auch ohne Blockade des CTLA-4 immer einige T-Zellen zur Proliferation angeregt. So ist zu erwarten, dass diese Aktivierung durch die Blockade von CTLA-4 auch entsprechend verstärkt wird. Aber gerade die nur sehr geringe Verstärkung der T-Zellantwort zeigt, dass die Zugabe des Fab-Fragmentes keine eigene mitogene Wirkung

hat, wie sie z.B. durch PHA vermittelt wird, sondern nur dort greift, wo die T-Zellen spezifisch aktiviert werden.

3.1.6.1 Die Fab-Fragmente gegen CTLA-4 erhöhen leicht die unspezifische Proliferation der T-Zellen

Auch wenn die Verstärkung der Proliferation im wesentlichen von der Anwesenheit von Kostimulation in Form von B7.2 abhängig ist, so ist in einer Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 3.1.6.1 zu sehen, dass die Blockade von CTLA-4 durchaus die unspezifische Aktivierung von T-Zellen fördern kann (Abb. 3.1.6.1.1). Gezeigt ist dort nur die Proliferation der T-Zellen ohne Stimulus in Form von APC. Die Menge des eingebauten Thymidins ist sehr niedrig, d.h. die T-Zellen wurden praktisch nicht aktiviert. Dennoch führte auch hier die Zugabe von anti-CTLA-4-Fab-Fragment zu einer Verdopplung der Proliferationsrate. Die Werte liegen unter 200 cpm und sind damit um den Faktor 75 niedriger als bei der Stimulation mit SkMel B7.2. Ein in gleicher Konzentration eingesetztes Kontroll-Fab-Fragment (UPC10) führte hingegen zu keinem solchen Anstieg der Proliferation. Die Proliferation stieg hier um ca. 15%.

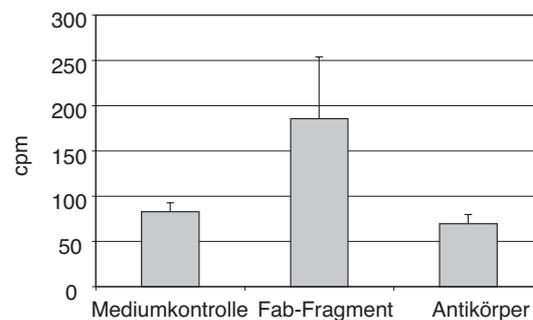


Abb. 3.1.6.1.1 Die Fab-Fragmente gegen CTLA-4 erhöhen leicht die unspezifische Proliferation der T-Zellen. $1 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden für sieben Tage mit Medium (Mediumkontrolle), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CTLA-4-Fab-Fragment (Fab-Fragment) oder 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gesamtantikörper inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt und ist in counts per minute angegeben. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei Versuche.

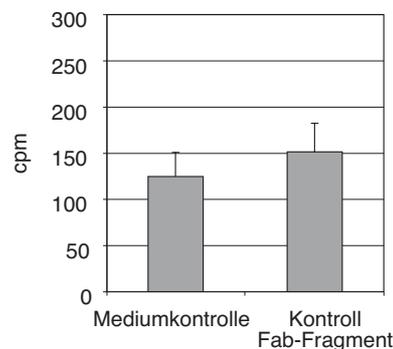


Abb. 3.1.6.1.2 Die Kontroll-Fab-Fragmente erhöhen die unspezifische Proliferation der T-Zellen nicht. $1 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden für sieben Tage mit Medium (Mediumkontrolle) oder 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kontroll-Fab-Fragmente (Kontroll Fab-Fragment) inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt und ist in counts per minute angegeben. Das Experiment ist repräsentativ für drei Versuche.

3.1.6.2 Die Steigerung der Proliferation ist unabhängig von der Stärke der Kostimulation

Bei einer Reihe von Experimenten fiel auf, dass die verstärkte Aktivierung der T-Zellen durch die Fab-Fragmente dann besonders stark ausfiel, wenn die Einbauraten des ^3H -Thymidins bei normaler Stimulation recht niedrig waren. Wie Abb. 3.1.4.2 zeigt, konnten die cpm bei einer Stimulierung der T-Zellen durch SkMel B7.2 durchaus Werte über 40.000 erreichen. In Abb. 3.1.6.1 liegen die Werte bei gleichen Versuchsparametern nur bei 5000 cpm.

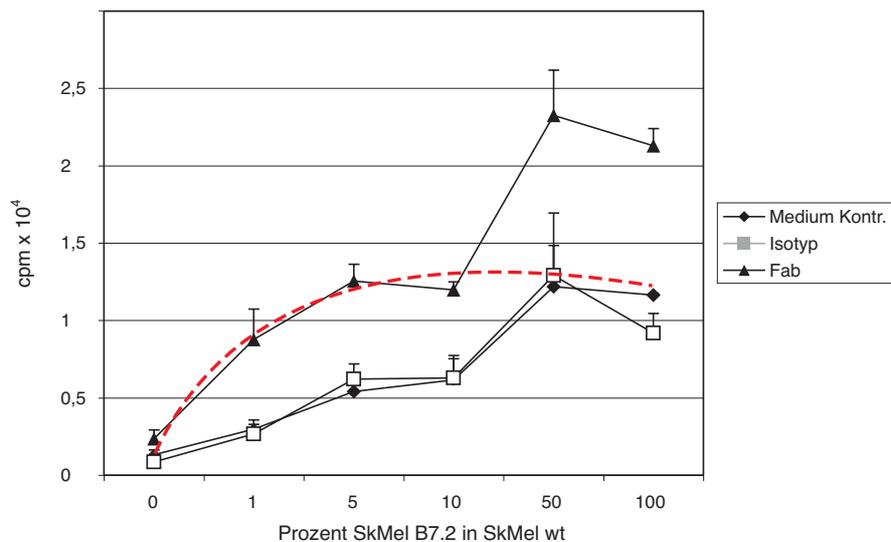


Abb. 3.1.6.2.1 Die Verstärkung der T-Zellantwort durch das Fab-Fragment ist unabhängig von der Konzentration der Kostimulation durch SkMel B7.2. $1 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden für sieben Tage mit $5 \cdot 10^4$ SkMel inkubiert. Auf der X-Achse ist der prozentuale Anteil der SkMel B7.2 an der SkMel wt angegeben. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der eingebauten ^3H -Thymidinmenge und ist in cpm angegeben. Die rote Linie zeigt die erwarteten Ergebnisse, wenn die Steigerung der Proliferation bei einer Blockade von CTLA-4 nur bei einer suboptimalen Kostimulation wirksam wäre.

Wenn bei dem Versuch in Abb. 3.1.4.2 auch kein Fab-Fragment eingesetzt wurde, so gab es doch die Überlegung, dass eine optimale Stimulation der T-Zellen möglicherweise zu einer maximalen Proliferation führt, die sich auch durch die Blockade des inhibitorischen Signals von CTLA-4 nicht mehr steigern lässt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der Kostimulus reduziert. Dazu wurden die SkMel B7.2 in SkMel wt verdünnt, sodass nur noch 1, 5, 10 oder 50% der Stimulatorzellen das kostimulatorische Molekül B7.2 exprimierten und damit in der Lage waren, T-Zellen vollständig zu aktivieren.

Abb. 3.1.6.3.1 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches. Würde diese Hypothese stimmen, hätten sich die Zellen so verhalten müssen, wie es die rote gestrichelte Linie zeigt. Bei niedriger Kostimulation und damit schwacher Aktivierung, hätte der Einfluss des Fab-Fragmentes stärker ausfallen sollen als bei voller Aktivierung durch 100% SkMel B7.2 Zellen. Dieses ließ sich aber nicht zeigen. Die Zugabe von anti-CTLA Fab-Fragment führte in diesem Experiment bei allen SkMel B7.2 Konzentrationen zu einer ungefähren Verdopplung der eingebauten ^3H -Thymidinmenge.

3.1.7 Wie wirkt die CTLA-4 Blockade?

Nachdem in dem Abschnitt 3.1.6 gezeigt werden konnte, dass eine Blockade von CTLA-4 zu einer Verstärkung der T-Zellantwort führt, sollte nun geklärt werden, durch welche Mechanismen dies geschieht. Vier mögliche Mechanismen, die im Endeffekt zu einer verstärkten Proliferation führen, kommen dafür in Frage:

1. Die Blockade von CTLA-4 verhindert den aktivierungsinduzierten Zelltod von aktivierten T-Zellen. Dazu müsste CTLA-4 vor allem zu einem späten Zeitpunkt blockiert werden.
2. Eine Blockade während der ersten 24 oder 48 h des Primings der T-Zellen reicht für eine Verstärkung der Immunantwort aus, da die Blockade nur initial zu einer Senkung der Aktivierungsschwelle führt.
3. CTLA-4 muss über die gesamte Dauer der Stimulation blockiert werden, um zu verhindern, dass die Aktivierungsschwelle der T-Zellen angehoben wird, bzw. die T-Zellen nach wenigen Zellteilungen mit der Proliferation aufhören. Dies spräche gegen einen Einfluss auf das Überleben der T-Zellen nachdem sie mehrere Zellzyklen durchlaufen haben.
4. Eine Blockade des CTLA-4 führt zu einer beschleunigten Aktivierung der T-Zellen und damit schnelleren Kinetik der Proliferation.

3.1.7.1 Wann wirkt CTLA-4?

Als erstes sollte versucht werden zu klären, ob eine Blockade für 24 oder 48 h ausreicht, um die T-Zellantwort zu verstärken. Für diese Versuche wurde der Zellkulturüberstand mit dem anti-CTLA-4 Fab-Fragment zu verschiedenen Zeitpunkten entfernt und durch normales Medium ersetzt. Die Überstände wurden mit zwei verschiedene Methoden entfernt. Zum einen wurde die Überstände vollständig mit einer Pipette entfernt und dann die Vertiefungen mit 200 μ l frischen Medium aufgefüllt. Zum anderen wurden die Zellen zuerst resuspendiert, zentrifugiert, dann der Überstand entfernt und anschließend neues Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden dann wieder auf die Vertiefungen der Zellkulturplatte verteilt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Methoden bei der Bestimmung der Proliferation. Die Auswertung der Versuche erfolgte sowohl durch Messung des ^3H -Thymidineinbaus als auch im FACS (ohne Abb.). In Abb. 3.1.7.1. wurde der Fab-Fragment-haltige Überstand gar nicht, nach 24 Stunden oder nach 48 Stunden entfernt. Die hellgrauen Balken in Abb. 3.1.7.1 zeigen die sehr schwache Proliferation nach Stimulation mit SkMel wt. Die dunkelgrauen Balken geben die Proliferation nach der Stimulation mit SkMel B7.2 wieder. Die Aktivierung erfolgte unter normalen Bedingungen (Kontrolle) oder mit einer Blockade des CTLA-4 durch 10 μ g/ml anti CTLA-4-Fab-Fragment (Fab).

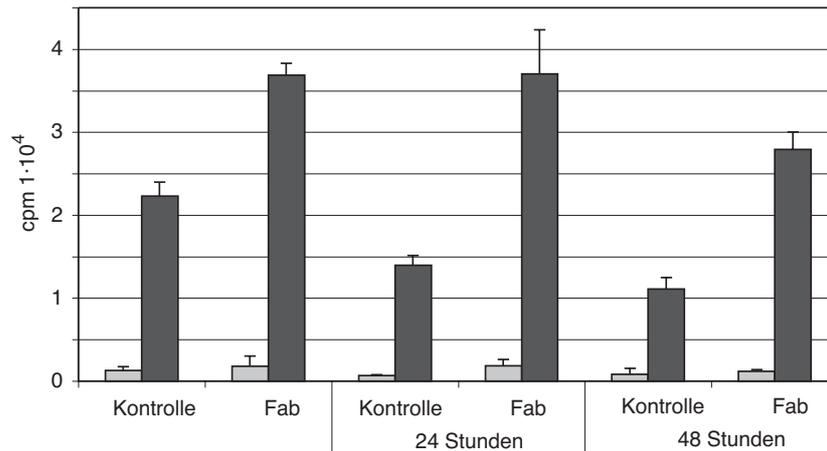


Abb. 3.1.7.1.1 Eine Blockade von CTLA-4 während der ersten 24 Stunden der Stimulation reicht aus, um die Proliferation der T-Zellen zu steigern. Eingesetzt wurden $5 \cdot 10^4$ SkMel und $1 \cdot 10^5$ T-Zellen je Vertiefung einer Mikrotiter Flachbodenplatte. „SkMel wt“, und „SkMel 7.2“ stehen für die entsprechende SkMel-Zellen, die als Stimulator verwendet wurden. „Kontrolle“: keine CTLA-4 Blockade. „Fab“: CTLA-4 Blockade durch $10 \mu\text{g/ml}$ anti CTLA-4-Fab-Fragment. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der eingebauten ^3H -Thymidinmenge und ist in cpm angegeben. 24 bzw. 48 Stunden: Der Überstand wurde nach dieser Zeit entfernt und durch normales R10hmn-Medium ersetzt. Die Abbildung ist repräsentativ für drei Versuche.

Es zeigte sich durch das Entfernen des Überstandes nach 24 Stunden, dass eine Blockadedauer von 24 Stunden ausreichte, um die T-Zellen verstärkt zur Proliferation anzuregen. Wie nicht anders zu erwarten, führte ein Entfernen des Überstandes nach 48 Stunden dann zu den gleichen Ergebnissen wie ein Entfernen nach 24 Stunden. Wenn die Blockade von CTLA-4 erst zu einem späteren Zeitpunkt, z.B. während der Phase des Aktivierungs-induzierten Zelltodes, wirksam wäre und nicht während der Primingphase, hätte die Proliferation ungefähr gleich ausfallen müssen, wie bei der Kontrolle nach 24 Stunden. In diesem Fall hätte die Stimulation zusammen mit anti-CTLA-4-Fab-Fragment während der ersten 48 Stunden keine Wirkung und die Proliferation wäre vergleichbar mit einer normalen Stimulation von T-Zellen durch SkMel B7.2. bzw. SkMel wt.

3.1.7.2 Kinetik der T-Zellproliferation mit und ohne Blockade von CTLA-4

Da eine erhöhte Überlebensrate von aktivierten T-Zellen als Grund für die verstärkte Proliferation unwahrscheinlich ist, bleiben zwei weiterer Mechanismen, die diese Verstärkung erklären können: Es könnte sich die Kinetik der Aktivierung beschleunigen, d.h. die T-Zellen werden schneller aktiviert und haben nach sieben Tagen bereits ein oder zwei Zellzyklen mehr durchlaufen als T-Zellen, deren CTLA-4 nicht blockiert wird. Es ist auch möglich, dass die Anzahl der ruhenden T-Zellen steigt, die überhaupt aktiviert werden, dass also insgesamt mehr T-Zellen rekrutiert werden. In diesem Fall wäre die Kinetik der Aktivierung gleich, aber die Zahl der proliferierenden Zellen würde steigen. Beide Szenarien würden im Endeffekt zu einem verstärkten Einbau von ^3H -Thymidin führen, ließen sich also mit dieser Methode nicht unterscheiden.

Um zwischen den beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden die T-Zellen daher vor Beginn des jeweiligen Experiment mit grün-fluoreszierendem CFSE markiert. Mit jeder Zellteilung wird der Farbstoff auf die zwei Tochterzellen verteilt. Über die Halbierung der Fluoreszenz im grünen Kanal (Fl-1) lässt sich so die Zahl der Zellen bestimmen, die sich geteilt haben und auch angeben, wie viele Zellzyklen sie durchlaufen haben. Dem entsprechend befinden sich in den FACS-Abbildungen die Zellen, die sich nicht geteilt haben ganz rechts auf der X-Achse. In den nachfolgenden FACS-Abbildungen (ab 3.1.7.2.2) sind die sich teilenden Zellen auf der X-Achse (Fl-1) gegen die Expression von CD4 bzw. CD8 auf der Y-Achse (Fl-4) aufgetragen.

Die T-Zellen wurden wie oben beschrieben mit SkMel wt bzw. SkMel B7.2 stimuliert und für 3, 5 und 7 Tage mit oder ohne anti-CTLA-4-Fab-Fragment oder Gesamtantikörper inkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen mit anti-CD4-Cy5 bzw. anti CD8-Cy5 gefärbt und im FACS-Calibur ausgewertet. Die Analyse der Proliferation nach 3, 5 und 7 Tagen, bei der durch Verwendung von CFSE jede sich teilende Zelle sichtbar wird, gab Aufschluss darüber, wann die ersten Zellen anfangen, sich zu teilen. Dadurch wird auch sichtbar, ob dies unter dem Einfluss einer Blockade des CTLA-4 schneller geschieht als bei einer normalen allogenen Stimulation.

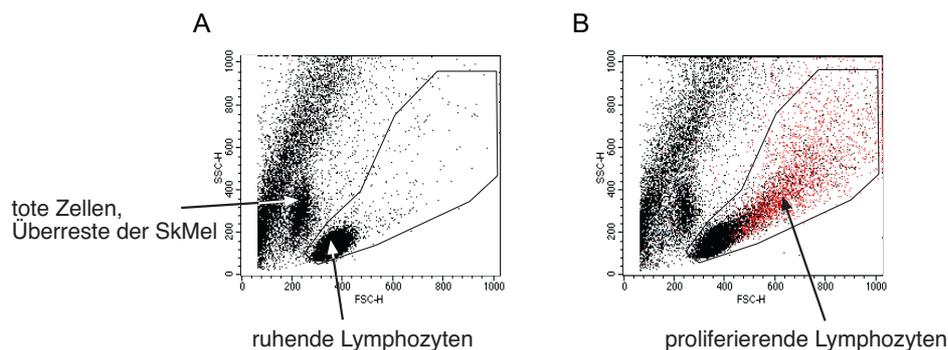


Abb. 3.1.7.2.1 Unterschiede zwischen aktivierten und nichtaktivierten T-Zellen im FACS. Der Forward/Sideward-Blot zeigt das unterschiedliche Erscheinungsbild von T-Zellen, die entweder sieben Tage mit SkMel wt (A) oder SkMel B7.2 (B) stimuliert wurden. Die roten Punkte repräsentieren die proliferierenden T-Zellen. Alle Zellen innerhalb des gates wurde für die Abb. 3.1.7.2.2-4 ausgewertet.

In Abb. 3.1.7.2.1 sind die Forward/Sideward-blots der FACS-Auswertung dargestellt. Abb. 3.1.7.2.1A zeigt die mit SkMel wt stimulierten T-Zellen und Abb. 3.1.7.2.1B die mit SkMel B7.2 stimulierten T-Zellen. Schon an Hand dieser Abbildungen lässt sich erkennen, dass die T-Zellen von den Wildtyp-Zellen nicht aktiviert wurden, da diese klein und rund bleiben und so mit eine homogene Population bilden. Proliferierende T-Zellen wurden dagegen größer und zeigten eine entsprechend andere Lage im Forward/Sideward-Blot bei der FACS-Analyse. Die roten Punkte in Abb. 3.1.7.2.1B zeigen die Lymphozyten, die auf den allogenen Stimulus mit Proliferation reagierten. Das gate für die Auswertung der Proliferation wurde so gewählt, dass die Überreste der SkMel und sterbende Zellen möglichst sauber von den T-Zellen getrennt wurden. Es zeigte sich aber, dass dies nicht immer möglich war. Dies hatte zur Folge, dass ein Teil dieser Reste bei der Darstellung Fl-1 (CFSE) gegen FL-4 (Cy5) im unteren linken Quadranten auftauchte (z.B. Abb. 3.1.7.2.2). Dies

erschwerte die Auswertung der statistische Daten, da der Anteil an Zellfragmenten u.ä. nicht eindeutig zu bestimmen war. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich deshalb immer auf die Anzahl der CD4⁺ bzw. CD8⁺-T-Zellen und nicht auf die gesamten gemessenen Ereignisse.

Nach drei Tagen war keine Proliferation sichtbar, weder bei Stimulation mit SkMel B7.2 noch mit SkMel wt (Abb. 3.1.7.2.2). Auch führte die Zugabe von 10 µg/ml anti-CTLA-4-Fab-Fragment noch nicht zu einer Proliferation. Diese zeigte, dass eine Blockade von CTLA-4 nicht zu einer schnelleren Aktivierung und damit Beginn der Zellteilung zu einem früheren Zeitpunkt der T-Zellen führt (Abb. 3.1.7.2.2 rechte Spalte).

Auch nach fünf Tagen Stimulation mit SkMel wt sind dort keine proliferierenden T-Zellen sichtbar (Abb. 3.1.7.2.3). Bei einer Stimulation mit den B7.2 transfizierten SkMel sind jetzt erstmals T-Zellen sichtbar, die sich im Schnitt einmal geteilt haben. Einige wenige CD4⁺-T-Zellen in der Kontrolle und jetzt schon deutlich mehr CD4⁺-T-Zellen nach der Blockade von CTLA-4 haben geteilt. Es scheint so, als würden die T-Zellen bis zu 4-5 Tage brauchen, bis sie nach einer allogenen Stimulation anfangen zu proliferieren.

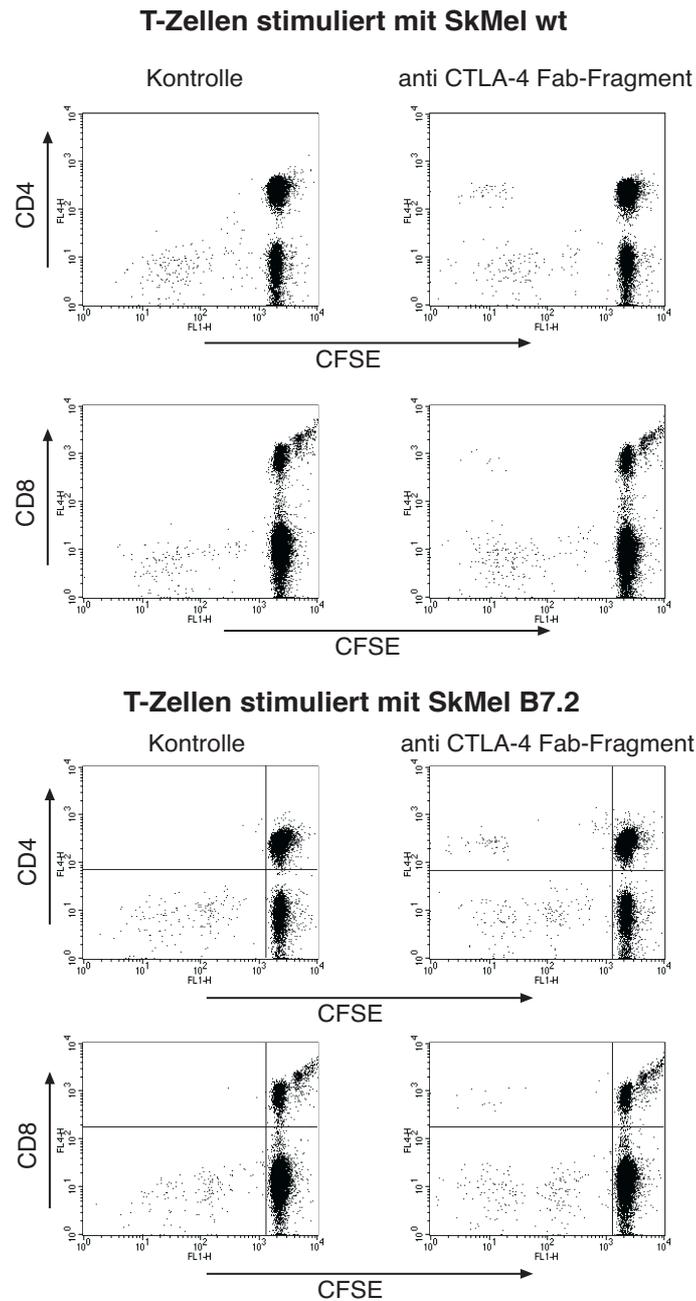


Abb. 3.1.7.2.2 Kein Unterschied im Proliferationsmuster nach der Blockade von CTLA-4 (Tag 3). CFSE-markierte T-Zellen wurden für drei Tage mit SkMel B7.2 bzw. SkMel wt inkubiert. Den Zellen war entweder nur Medium (Kontrolle) oder 10 µg/ml anti CTLA-4-Fab-Fragment zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend mit anti-CD4-Cy5 bzw. anti-CD8-Cy-5 gefärbt und im FACS ausgewertet. Für die Auswertung wurden nur die lebenden Lymphozyten berücksichtigt.

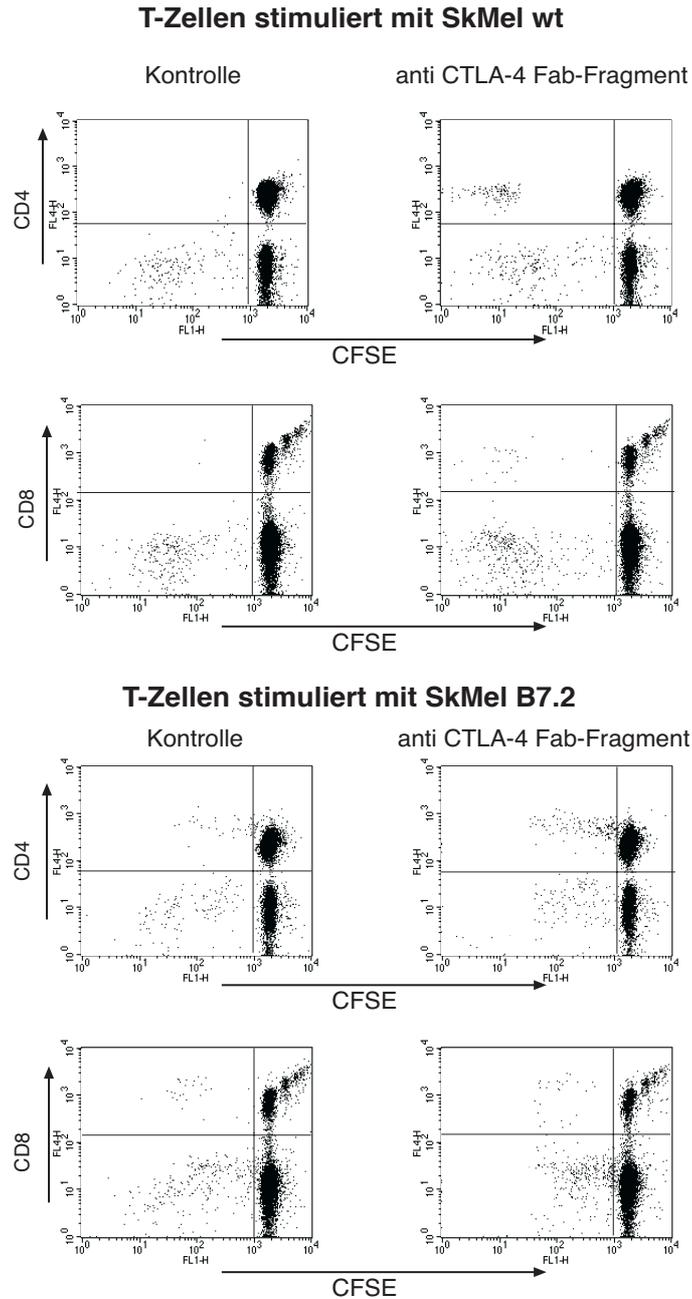


Abb. 3.1.7.2.3 Kein Unterschied im Proliferationsmuster nach der Blockade von CTLA-4 (Tag 5). CFSE-markierte T-Zellen wurden für fünf Tage mit SkMel B7.2 bzw. SkMel wt inkubiert. Den Zellen war entweder nur Medium (Kontrolle) oder 10 µg/ml anti CTLA-4-Fab-Fragment zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend mit anti-CD4-Cy5 bzw. anti-CD8-Cy-5 gefärbt und im FACS ausgewertet. Für die Auswertung wurden nur die lebenden Lymphozyten berücksichtigt.

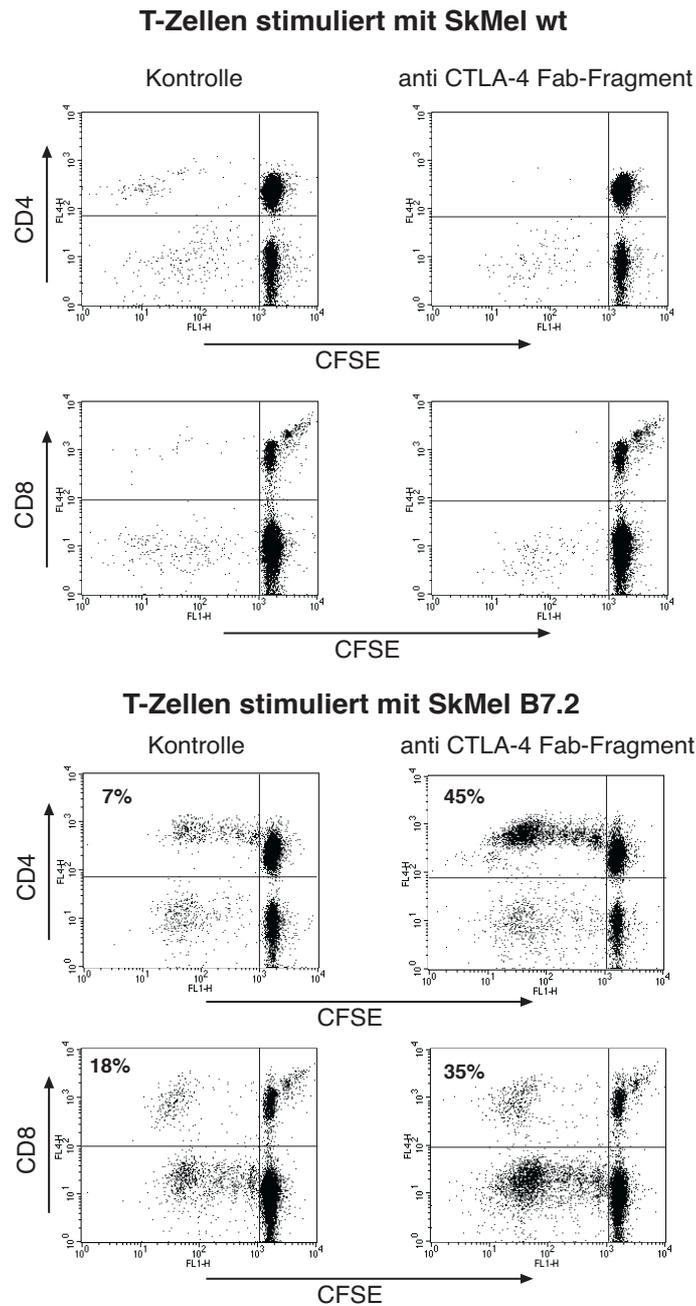


Abb. 3.1.7.2.4 Kein Unterschied im Proliferationsmuster nach der Blockade von CTLA-4 (Tag 7). CFSE-markierte T-Zellen wurden für drei Tage mit SkMel B7.2 bzw. SkMel wt inkubiert. Den Zellen war entweder nur Medium (Kontrolle) oder 10 $\mu\text{g/ml}$ anti CTLA-4-Fab-Fragment zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend mit anti-CD4-Cy5 bzw. anti-CD8-Cy-5 gefärbt und im FACS ausgewertet. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der proliferierenden CD4⁺ oder CD8⁺-T-Zellen in dem oberen linken Quadranten an, bezogen auf alle CD4 oder CD8-positiven Zellen. Für die Auswertung wurden nur die lebenden Lymphozyten berücksichtigt.

Die nächsten und letzten Experimente der Versuchsreihe wurden nach sieben Tagen ausgewertet (Abb. 3.1.7.2.4). In diesem Experiment kam es auch nach sieben Tagen zu keiner Proliferation von T-Zellen, die mit SkMel wt stimuliert wurden. Die Stimulation mit SkMel B7.2 hingegen führte zu einem deutlichen Anstieg von proliferierenden CD4 und CD8-T-Zellen. Die Blockade von CTLA-4 erhöhte den Anteil an sich teilenden Zellen

noch weiter. Während unter normalen Stimulationsbedingungen sich 7% der CD4⁺-T-Zellen in der Proliferation befinden, stieg deren Anteil nach der Zugabe des Fab-Fragmentes auf 45% an; eine Steigerung um den Faktor 6,2. Bei den CD8⁺-T-Zellen waren in diesem Experiment 18% der Zellen in der Proliferation und nach der Blockade von CTLA-4 verdoppelte sich dieser Anteil. Beide Subpopulationen reagierten also mit einer verstärkten Aktivierung auf die Blockade von CTLA-4.

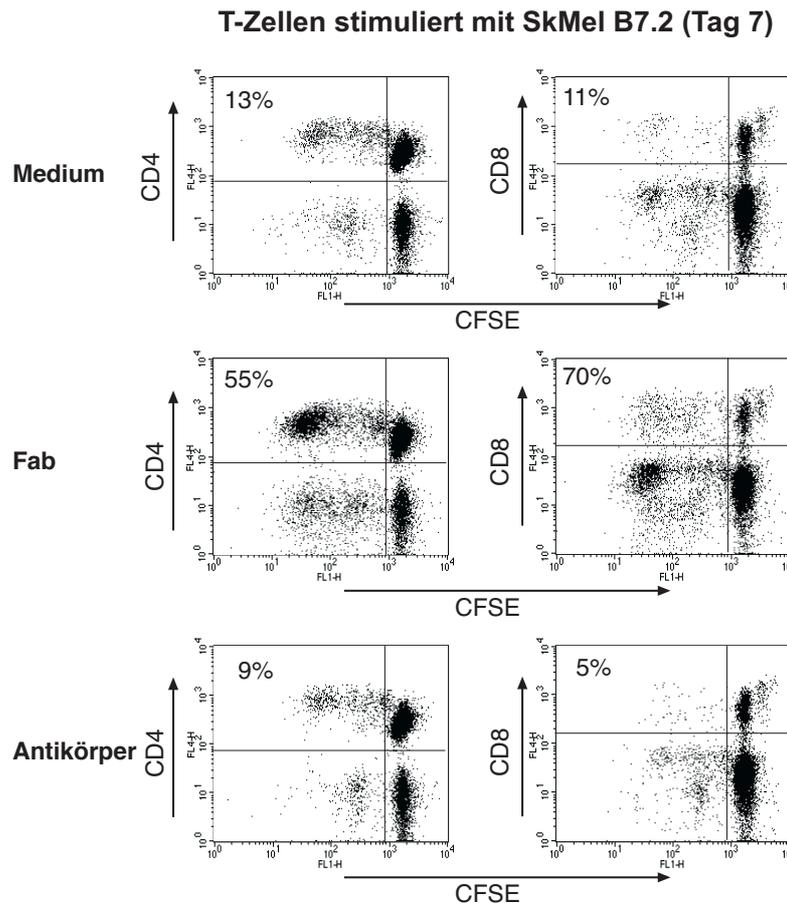


Abb. 3.1.7.2.5 Anteil der proliferierenden CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen nach sieben Tagen Stimulation mit SkMel B7.2. CFSE-markierte T-Zellen wurden für sieben Tage mit SkMel B7.2 bzw. SkMel wt (ohne Abb.) inkubiert. Den Zellen war entweder nur Medium (Medium), 10 µg/ml anti CTLA-4-Fab-Fragment (Fab) oder 10 µg/ml anti CTLA-4-Antikörper zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend mit anti-CD4-Cy5 bzw. anti-CD8-Cy-5 gefärbt und im FACS ausgewertet. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der proliferierenden CD4⁺ oder CD8⁺-T-Zellen in dem oberen linken Quadranten an, bezogen auf alle CD4 oder CD8-positiven Zellen. Für die Auswertung wurde nur die lebenden Lymphozyten berücksichtigt.

Der in Abb. 3.1.7.2.2-4 dargestellte Versuch ist repräsentativ für vier Experimente. In Abb. 3.1.7.2.5 ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt, bei dem zusätzlich noch der unmodifizierte Antikörper BNI3 eingesetzt wurde. Auch hier waren nach drei und fünf Tagen praktisch keine proliferierenden T-Zellen sichtbar (ohne Abb.). Die Auswertung nach Tag 7 zeigte, dass hier unter normalen Bedingungen prozentual mehr CD4⁺ als CD8⁺

T-Zellen aktiviert worden waren. Beide Populationen proliferierten aber deutlich stärker, wenn CTLA-4 blockiert wurde. Der Anteil der proliferierenden $CD4^+$ -Zellen stieg um mehr als das vierfache und der Anteil der $CD8^+$ -T-Zellen hier sogar um den Faktor 6. Offensichtlich hängt es vom Spender ab, wie hoch der Anteil an $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ -T-Zellen ist, der aktiviert wird. Die Kinetiken und das Muster der Proliferation unterschieden sich jedoch nicht. Vor allem bei den $CD4^+$ -T-Zelle, die unter Einfluss des Fab-Fragment stimuliert wurden, ist deutlich sichtbar, dass, wie in Abb. 3.1.7.2.4, fast alle Zellen, die proliferieren, auch sechs Zellzyklen durchlaufen (siehe auch Abb. 3.1.8.1). Auch in diesem Experiment zeigten die $CD4^+$ und $CD8^+$ -T-Zellen ein gleiches Proliferationsmuster. Die Zugabe des Gesamtantikörpers hingegen führte zu keiner Zunahme der Proliferation, sondern inhibierte die Aktivierung der T-Zellen sogar.

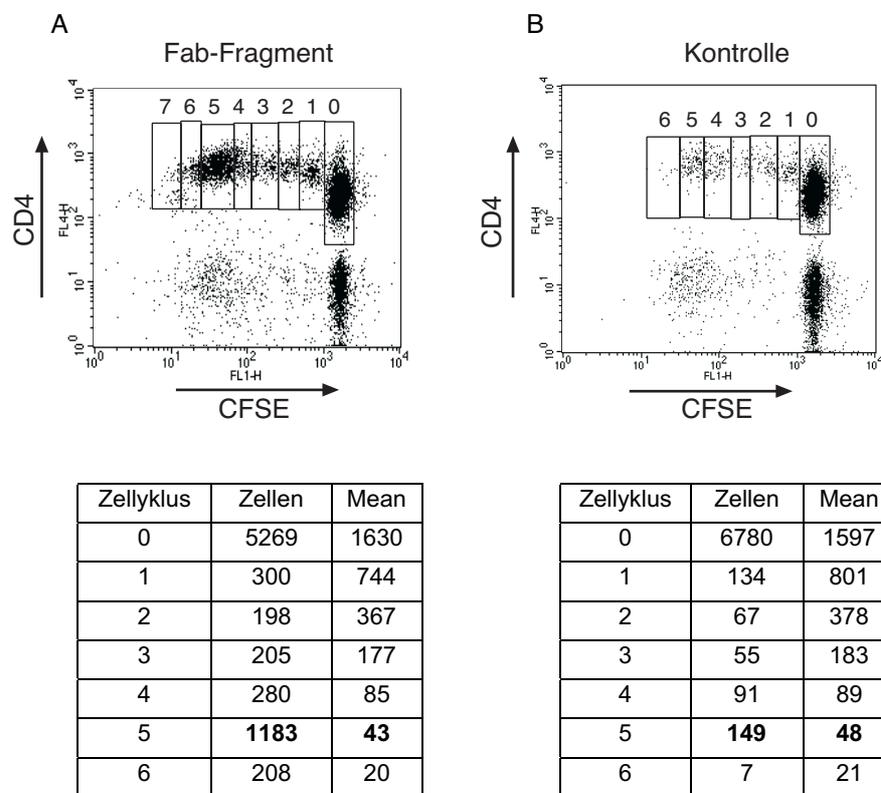


Abb. 3.1.7.2.6 Über die Halbierung der Fluoreszenzintensität lässt sich die Anzahl der Zellen je Zellzyklus bestimmen. Die FACS-Abbildungen wurden, wie unter Abb. 3.1.7.2.4 beschrieben, erstellt. Die Zellen wurden mit Medium alleine (Kontrolle) oder mit anti-CTLA-4-Fab-Fragment inkubiert. Da sich mit jeder Teilung die Intensität der Fluoreszenz in den Zellen halbiert, lässt sich durch Anzeigen der „mean“ (mittleren Fluoreszenzintensität) in der CellQuest Software bestimmen, wann die „mean“ der Zellen sich relativ zu den sich nicht-teilenden Zellen halbiert hat und sich die Zellen somit einmal geteilt haben. Dies wurde als „Zellzyklus-gates 0-6“ in die FACS-Abbildung eingetragen. Auf diese Weise wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die bis zu sechs Zellzyklen durchlaufen haben. Für die beiden FACS-Abbildungen sind diese Zahlen in den beiden Tabellen zusammengefasst.

Es wird deutlich, dass die sich teilenden Zellen alle das gleiche Proliferationsmuster aufweisen. Da sich mit jeder Teilung die Fluoreszenz der Zellen halbiert, kann man über die

mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) die Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen bestimmen. In Abb. 3.1.7.2.6 sind diese „Zellzyklus-Gates“ in die FACS-Auswertungen eingetragen. Wie an Hand der Tabelle sichtbar ist, ist jeder Zellzyklus durch die Halbierung der mittleren Fluoreszenzintensität gekennzeichnet. Kopiert man diese gates in alle FACS-Auswertungen einer Versuchsreihe so lässt sich ermitteln, wie viele Zellen sich wie oft geteilt haben.

Für die CD4⁺-T-Zellen einer Versuchsreihe sind diese Daten in Abb. 3.1.7.2.7 zusammengefasst. Aufgetragen wurde die Anzahl der Zellen je Zellzyklus gegen die durchlaufenen Zellzyklen. Die Blockade von CTLA-4 (rote Linie) und die normale Stimulation (schwarze Linie) führen beide zu einer Aktivierung, bei der die meisten Zellen nach sieben Tagen fünf Zellzyklen durchlaufen haben, nur befinden sich nach der Blockade des CTLA-4 weit aus mehr Zellen in diesem Zustand. Auch bei anderen Versuchsreihen zeigte sich, dass die Proliferationsmuster identisch sind, aber z.T. hatten sich die T-Zellen sogar 8-9 mal geteilt (Abb. 3.1.8.1)

Die Blockade von CTLA-4 bewirkt also keine Beschleunigung der Aktivierung von T-Zellen, sodass diese schneller anfangen würden, sich zu teilen. Es scheint viel mehr so, als würde die Anzahl der Zellen ansteigen, die überhaupt auf den allogenen Stimulus reagiert.

Weiterhin lässt sich aus diesen Daten ungefähr die Zeit abschätzen, die T-Zellen brauchen, um einen Zellzyklus zu durchlaufen, sobald sie einmal aktiviert worden sind. Wie in Abb. 3.1.7.2.3 zu sehen ist, haben sich die Zellen nach fünf Tagen noch nicht geteilt. Nach sieben Tagen hingegen haben sie fünf Zellteilungen durchlaufen (Abb. 3.1.7.2.4). Ausgehend von diesen Daten, bräuchte eine T-Zelle nur ungefähr 10 Stunden, um sich einmal zu teilen.

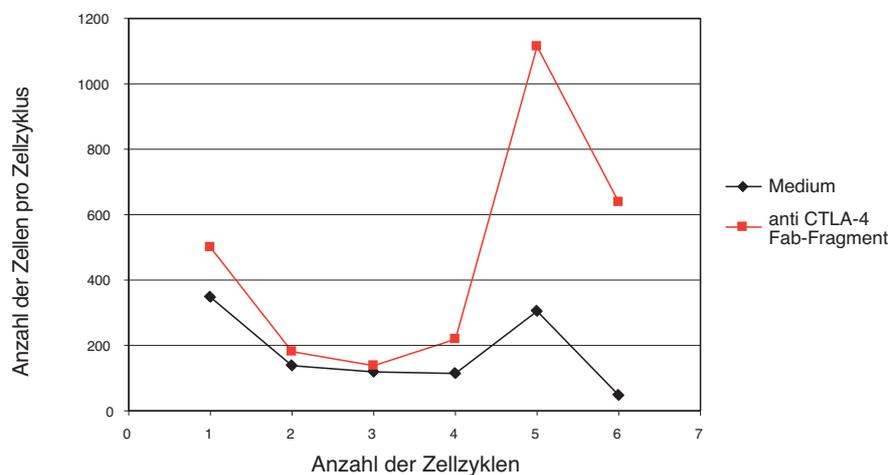


Abb. 3.1.7.2.7 Die Blockade von CTLA-4 führt zu mehr Zellen pro Zellzyklus, aber zu keiner Veränderung der Kinetik der Proliferation. Die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen je Zellzyklusgate aus Abb. 3.1.7.2.6 wurde gegen die Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen aufgetragen. Die schwarzen Symbole und Linien zeigen die CD4⁺-T-Zellen ohne CTLA-4-Blockade, die roten Symbole und Linien die CD4⁺-T-Zellen nach der Zugabe von anti-CTLA-4-Fab-Fragment.

3.1.7.3 Abschätzung der Vorläufer-Frequenzen

Wie in Abschnitt 3.1.7.2 gezeigt ist, ist die Kinetik und das Muster der Proliferation unabhängig von der Anwesenheit von anti-CTLA-4 Fab-Fragment. Dies bedeutet, zusammen mit dem Ergebnis, dass CTLA-4 nicht das Überleben beeinflusst (3.1.7.1), dass durch eine Blockade des CTLA-4 eine höhere Anzahl von T-Zellen aktiviert wird. Aus den statistischen Daten der FACS-Analysen lässt sich ungefähr die Zahl der Vorläuferzellen abschätzen. Um die Daten miteinander vergleichen zu können, werden die Werte nicht auf die eine FACS-Messung bezogen, sondern auf Vorläuferzellen je $1 \cdot 10^5$ Zellen. Dafür wird von der Annahme ausgegangen, dass sich die Anzahl der nicht-proliferierenden Zellen im Verlauf des Experiments nicht wesentlich verändert. Selbst wenn bis zu 1000 Zellen anfangen sich zu teilen, bleibt ihr Anteil im Vergleich zu den eingesetzten $1 \cdot 10^5$ Zellen vernachlässigbar gering. Zeigt die FACS-Statistik nun 6000 nicht-proliferierende $CD4^+$ -T-Zellen an, so ist diese Anzahl mit 11 zu multiplizieren, um auf die Menge an $CD4^+$ -T-Zellen in $1 \cdot 10^5$ T-Zellen aus peripheren Blut zu gelangen. Außerdem zeigen die „gates“ in Abb. 3.1.7.2.6 wie viele Zellen sich wie häufig geteilt haben. Da das Verhältnis von sich teilenden Zellen zu sich nicht teilenden Zellen gleich ist muss man auch die Anzahl der Zellen in jedem Zellzyklus mit 11 multiplizieren, um auf die Gesamtmenge der proliferierenden Zellen in einer Vertiefung zu gelangen. Um daraus auf die Anzahl der Zellen zu schließen, die angefangen haben sich zu teilen, muss die Anzahl der Zellen die sich siebenmal geteilt durch 128 geteilt werden, die Anzahl der Zellen die sechsmal geteilt haben durch 64 geteilt werden usw. Rechnet man diese Werte dann zusammen, gelangt man zu der Anzahl an T-Zellen in je $1 \cdot 10^5$ Zellen, die anfangen haben zu proliferieren. In Tabelle 3.1.1 sind die Ergebnisse einer solchen Abschätzung für $CD4^+$ -T-Zellen zu sehen. Wenn auch die absoluten Zahlen wahrscheinlich recht ungenau sind, so sind doch die Werte der einzelnen Experimente miteinander vergleichbar. Hier zeigt sich dann, dass bei einer Blockade des CTLA-4 während einer allogenen Immunantwort die Anzahl der Zellen, die auf den allogenen Stimulus reagieren, maximal um den Faktor 8 steigt

Tab. 3.1.1: Abschätzung der Anzahl an $CD4^+$ -T-Zellen in $1 \cdot 10^5$ peripheren T-Zellen, die nach dem allogenen Stimulus anfangen zu proliferieren. Die Werte kommen aus vier voneinander unabhängigen Experimenten. Kontrolle: ohne CTLA-4-Blockade. Fab: Blockade von CTLA-4 durch 10 $\mu\text{g/ml}$ anti CTLA-4 Fab-Fragment.

Kontrolle	Fab
171	1050
635	988
350	988
305	505

3.1.7.4 Keine Steigerung der Proliferation durch ein Kontroll-Fab-Fragment

Die Tatsache, dass die T-Zellen auch nach der Zugabe von anti-CTLA-4-Fab-Fragment nicht auf eine Stimulation mit SkMel wt reagieren, zeigt deutlich, dass die verstärkte Proliferation nicht von einer unspezifische Aktivierung der T-Zellen herrührt. Um auszuschlie-

ßen, dass es sich bei den beobachteten Effekten dennoch um unspezifische Effekte handelt, wurde ein Kontroll-Fab-Fragment hergestellt und mit 10 µg/ml in identischen Versuchen eingesetzt. In Abb. 3.1.7.4.1 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Der Proliferationsindex gibt an, wie die T-Zellen sich nach der Zugabe von anti-CTLA-4 Fab-Fragment bzw. Kontroll-Fab-Fragment im Vergleich zu der Stimulation mit SkMel B7.2 alleine verhielten (Proliferationsindex = 1). Es ist zu sehen, dass es nur bei der Blockade von CTLA-4 zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation kommt. Verwendet wurden nur Daten aus FACS-Analysen mit CFSE-markierten T-Zellen.

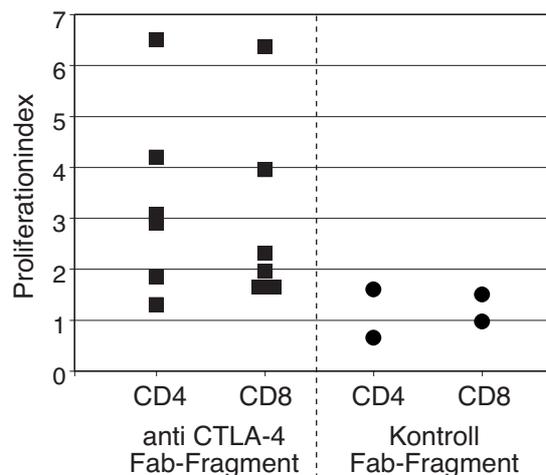


Abb. 3.1.7.4.1 Die Zugabe von 10 µg/ml eines Kontroll-Fab-Fragmentes steigert die Proliferation der T-Zellen nicht. Die Abbildung zeigt zusammengefasst die Steigerung der Proliferation nach Blockade von CTLA-4 (anti CTLA-4 Fab-Fragment) oder der Zugabe eines Kontroll Fab-Fragmentes. Der Proliferationsindex 1 gibt die Proliferation nach der Stimulation der CD4⁺ bzw. CD8⁺-T-Zellen nur mit SkMel B7.2 ohne die Zugabe eines Fab-Fragmentes wieder. Ausgewertet wurden die Daten aus FACS-Analysen mit CFSE-markierten T-Zellen.

3.8 Die verstärkte Antwort der CD8⁺-T-Zellen nach einer Blockade von CTLA-4 beruht wahrscheinlich auf einer verstärkten Hilfe durch CD4⁺-T-Zellen.

Die Abb. 3.1.7.4 und 3.1.7.5 zeigen, dass eine Blockade durch anti-CTLA-4 Fab-Fragment sowohl die CD4⁺, als auch die CD8⁺-T-Zellen verstärkt aktivieren kann. Wenn man den relativen Anstieg der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen vergleicht, fällt auf, dass z.B. in Abb. 3.1.7.5 die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen sich unter Einfluss des anti-CTLA-4 Fab-Fragmentes vervierfacht, die Anzahl der CD8⁺-Zellen sich aber mehr als versechsfacht. Während eine direkte Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen durch den allogenen Stimulus und damit auch ein direkter Einfluß des CTLA-4 auf die T-Helferzellen wahrscheinlich ist, ist dies bei CD8⁺-T-Zellen nicht sicher. Deshalb war es wichtig zu prüfen, ob die CD8⁺-T-Zellen direkt von dem Fab-Fragment beeinflusst werden oder die verstärkte Aktivierung auf den indirekten Einfluss der CD4⁺-T-Zellen beruht. In diesen Versuchen in Abschnitt 3.1.7.2 wurden die CD4 und CD8 positiven Zellen allerdings gemeinsam eingesetzt. Um diese Frage zu klären, sollten CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen nun separat eingesetzt werden. Für diese Experimente wurden aus den CFSE-markierten T-Zellen die CD4⁺ und CD8⁺-T-

Zellen über das Dynal Positive Isolation Kit positiv selektiert. Die so isolierten Zellen wurden auf ihre Reinheit im FACS untersucht (Abb. 3.1.8.1). Die CD4⁺ T-Zellen waren zu mehr als 99% positiv für CD4 und die CD8⁺ T-Zellen enthielten mehr als 97% CD8⁺-T-Zellen. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen je Vertiefung eingesetzt und nach sieben Tagen Inkubation mit Stimulatorzellen im FACS untersucht (Abb. 3.1.8.2). Dabei wurden zum Vergleich auch die unseparierten T-Zellen sowie die CD4 und CD8 gemeinsam im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

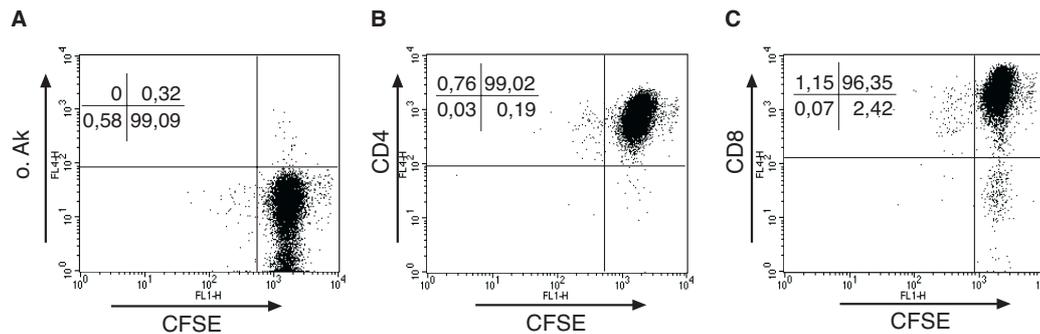


Abb. 3.1.8.1 Positive Isolation von CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen aus CFSE-markierten T-Zellen. Mit Hilfe des Dynal CD4 bzw. CD8 Positive Isolation Kit plus Detach wurden die CD4 und CD8 positiven T-Zellen aus den schon CFSE markierten T-Zellen positiv isoliert. Die Zellen wurden mit anti-CD4-Cy5 bzw. anti-CD8-Cy-5 auf ihre Reinheit untersucht. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der entsprechend gefärbten Zellen in dem Quadranten an. Für die Auswertung wurden nur die lebenden Lymphozyten verwendet. A: nicht gefärbte CD4⁺-T-Zellen. B: aufgereinigte CD4⁺-T-Zellen. C: aufgereinigte CD8⁺-T-Zellen

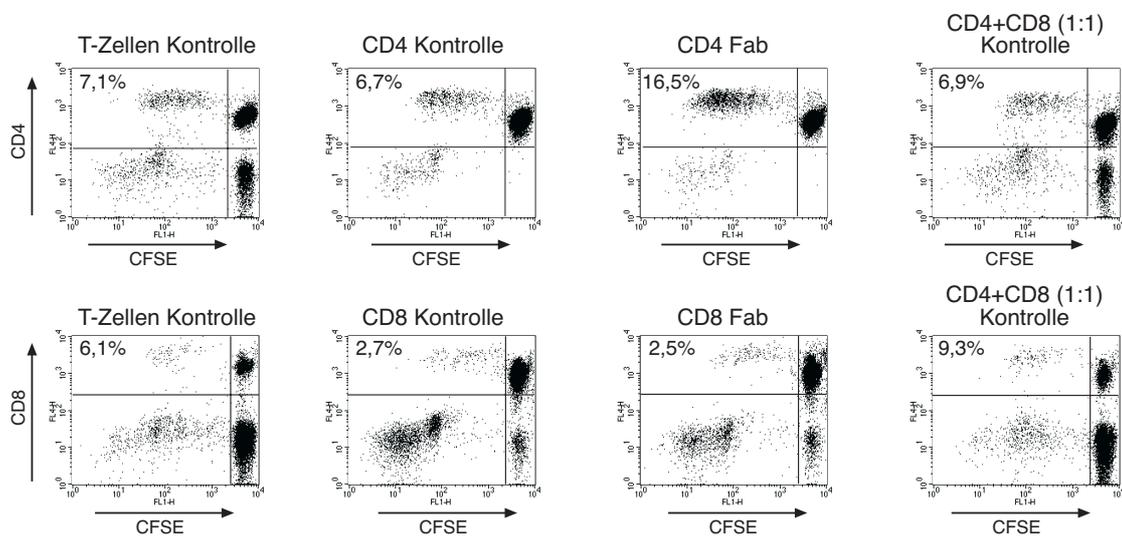


Abb. 3.1.8.2 Eine Blockade von CTLA-4 führt nur bei isolierten CD4⁺-T-Zellen und nicht bei isolierten CD8⁺-T-Zellen zu einer verstärkten Proliferation. Je $1 \cdot 10^5$ CFSE-markierte T-Zellen, isolierte CD4⁺-bzw. CD8⁺-T-Zellen und im Verhältnis 1:1 gemischte CD4 und CD8⁺-T-Zellen (CD4+CD8 (1:1)) wurden für sieben Tage mit je $5 \cdot 10^4$ SkMel B7.2 bzw. SkMel wt (ohne Abb.) inkubiert. Den Zellen war entweder nur Medium (Kontrolle) oder 10 µg/ml anti CTLA-4-Fab-Fragment (Fab) zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend mit anti-CD4-Cy5 bzw. anti-CD8-Cy-5 gefärbt und im FACS ausgewertet. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der proliferierenden CD4⁺ oder CD8⁺-T-Zellen in dem oberen linken Quadranten an, bezogen auf alle CD4 oder CD8-positiven Zellen. Für die Auswertung wurden nur die lebenden Lymphozyten berücksichtigt.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass der Anteil der proliferierenden CD4⁺-T-Zellen bei unseparierten T-Zellen mit 7,1% fast identisch zu den 6,7% bei isolierten CD4⁺-T-Zellen. Die Blockade von CTLA-4 läßt den Anteil der proliferierenden Zellen bei den isolierten CD4⁺-T-Zellen dann auf über 16% steigen. Wenn man die isolierten CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen wieder mischt (allerdings 1:1 und nicht etwa 1:3 wie im Blut) bleibt es bei ca 7% sich teilenden CD4⁺-T-Zellen. Die CD4⁺-T-Zellen scheinen also von der Abwesenheit von CD8⁺ oder auch noch von Spuren von APC völlig unbeeinflusst. Anders verhält es sich zumindest in diesem Experiment mit den CD8⁺-T-Zellen: Liegt der Anteil der proliferierenden Zellen bei den unseparierten T-Zellen noch bei 6% so sinkt er bei isolierten CD8⁺-T-Zellen auf 2,7%. Die CD8⁺-T-Zellen sind offensichtlich auf die Hilfe der CD4⁺-T-Zellen angewiesen. Dies zeigt sich auch darin, dass das Mischen der isolierten CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen die Anteil der sich teilenden CD8⁺-T-Zellen wieder erhöht und mit über 9% den Anteil in den unseparierten T-Zellen sogar übersteigt. Viel wichtiger ist allerdings, dass durch die Blockade von CTLA-4 der Anteil der proliferierenden Zellen im Gegensatz zu den CD4⁺-T-Zellen nicht steigern läßt. Der Prozentsatz bleibt unverändert bei etwa 2,5%. Aus diesem Versuch ließe sich ableiten, dass das CTLA-4 keine direkte Rolle bei der Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen spielt. Während dreimal gezeigt werden konnte, dass die CD8⁺-T-Zellen die Hilfe der CD4⁺-T-Zellen brauchen, muß zur Einschränkung gesagt werden, dass es sich nur einmal so zeigen ließ, dass die isolierten CD8⁺-T-Zellen nicht auf eine Blockade des CTLA-4 reagieren. In weiteren Versuch kam es z.T. zu gar keiner Proliferation der Zellen.

3.1.9 T-Zellen zeigen eine erhöhte IFN- γ Produktion unter Einfluss des anti-CTLA-4 Fab-Fragments

Wie in Abschnitt 3.1.7. zu sehen ist, steigt bei Blockade des CTLA-4 durch anti-CTLA-4 Fab-Fragment die Frequenz der Zellen, die durch die allogenen MHC-Moleküle der SkMel aktiviert werden. Dies führt dazu, dass mehr Zellen proliferieren. Doch es könnte sein, dass zwar mehr Zellen proliferieren, aber diese Zellen keine Effektorfunktion entwickeln. Da hinter der Blockade von CTLA-4 die Idee einer verbesserten Krankheitsabwehr steht, wurde untersucht, ob die zur verstärkten Proliferation angeregten Zellen auch Interferon- γ produzieren. Die T-Zellen wurden dazu wie oben beschrieben gereinigt und mit und ohne anti-CTLA-4 Fab-Fragment aktiviert. Sechs Stunden vor Ende des Experiments wurde 5 μ g/ml Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Brefeldin A blockiert den Transport von exozytotischen Vesikeln und verhindert so eine Abgabe von Interleukinen an das Medium. Dies erhöht deren Konzentration in der Zelle und erleichtert somit den Nachweis. Die T-Zellen wurden anschließend intrazellulär mit biotinyliertem anti-IFN- γ und dann Streptavidin-Alexa-Fluor-647 gefärbt. Zwar ließ sich eine erhöhte Expression von IFN- γ der T-Zellen sehen, doch da die IFN- γ exprimierenden T-Zellen im Forward/Sideward-Blot genau dort lagen, wo auch ein Teil des Hintergrundes erscheint, war eine genaue quantitative Auswertung nicht möglich (ohne Abb.). Um den Hintergrund zu reduzieren und eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurden in weiteren Experimenten die CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen nach Ende der Inkubationszeit positiv selektioniert.

In Abb. 3.1.9.1 B ist zu sehen, dass der durch die SkMel-Zellen verursachte Hintergrund im unteren linken Quadranten fast vollständig verschwunden ist. In der jetzt viel saubereren Messung ist der Effekt des anti-CTLA-4 Fab-Fragments auf die Produktion von IFN- γ deutlicher zu sehen und auch zu quantifizieren. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in der Tabelle 3.1.2 zusammengefasst. Sehr deutlich ist, dass die Zellen, die nicht proliferierten, auch kein Interferon- γ produzierten. Des weiteren geht aus diesem Versuch hervor, dass bei den CD4⁺-Zellen im Vergleich zu den CD8⁺-Zellen mehr Zellen IFN- γ produzierten. Beide Populationen haben aber gemeinsam, dass unter dem Einfluss des Fab-Fragmentes der Anteil an IFN- γ produzierenden Zellen stieg. Bei den CD8⁺-Zellen verdreifachte sich die Zahl sogar² und ihr Anteil stieg von 6,28% auf über 16%.

Durch eine Zuweisung von unterschiedlichen Farben zu den einzelnen Populationen, zeigte sich, dass die Zellen sich auch in ihrer Form und Granularität unterscheiden. Diese Unterschiede sind in dem Forward/Sideward-Blot in Abb. 3.1.9.2 A sichtbar. Bei den blauen Zellen handelt es sich um kleine, einheitliche CD4⁺-Zellen, die sich nicht teilen. Grün sind die Zellen eingefärbt, die sich zwar teilen, aber kein IFN- γ produzieren. In rot erscheinen schließlich die Zellen, die sich sowohl teilen, als auch IFN- γ produzieren. Es ist deutlich sichtbar, dass diese Zellen im Durchschnitt am weitesten oben und rechts erscheinen. Daraus lässt sich ablesen, dass die CD4⁺-Zellen, die IFN- γ produzierten, größer waren als die anderen Lymphozyten und auch eine höherer Granulierung aufwiesen; insgesamt ein Indiz für starke Aktivierung der T-Zellen. Außerdem war deutlich sichtbar, dass nur Zellen, die proliferierten, überhaupt IFN- γ produzierten. Es wäre immerhin denkbar gewesen, dass ein Teil der T-Zellen auf eine Aktivierung nicht mit Proliferation, sondern nur mit IFN- γ Produktion reagiert.

Eine Produktion von IL-4 konnte mit dieser Methode nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

A

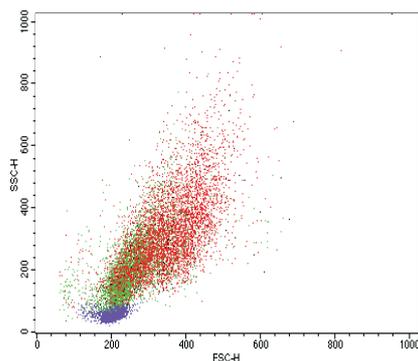


Abb. 3.1.9.1A Die IFN- γ produzierenden T-Zellen unterscheiden sich im FACS von Zellen, die kein IFN produzieren. Forward/Sideward Blot der CD4⁺-T-Zellen deren CTLA-4 blockiert wurde (Abb. 3.1.9.1B oben rechts). **Blau:** nicht proliferierende Zellen, die kein IFN- γ produzierten. **Grün:** proliferierende Zellen, die kein IFN- γ produzierten. **Rot:** proliferierende Zellen, die IFN- γ produzierten

² Die Berechnung bezieht mit ein, dass von den CD8⁺ mit Fab insgesamt 17070 Zellen und bei den CD8⁺ ohne Fab nur 10410 Zellen gemessen wurden.

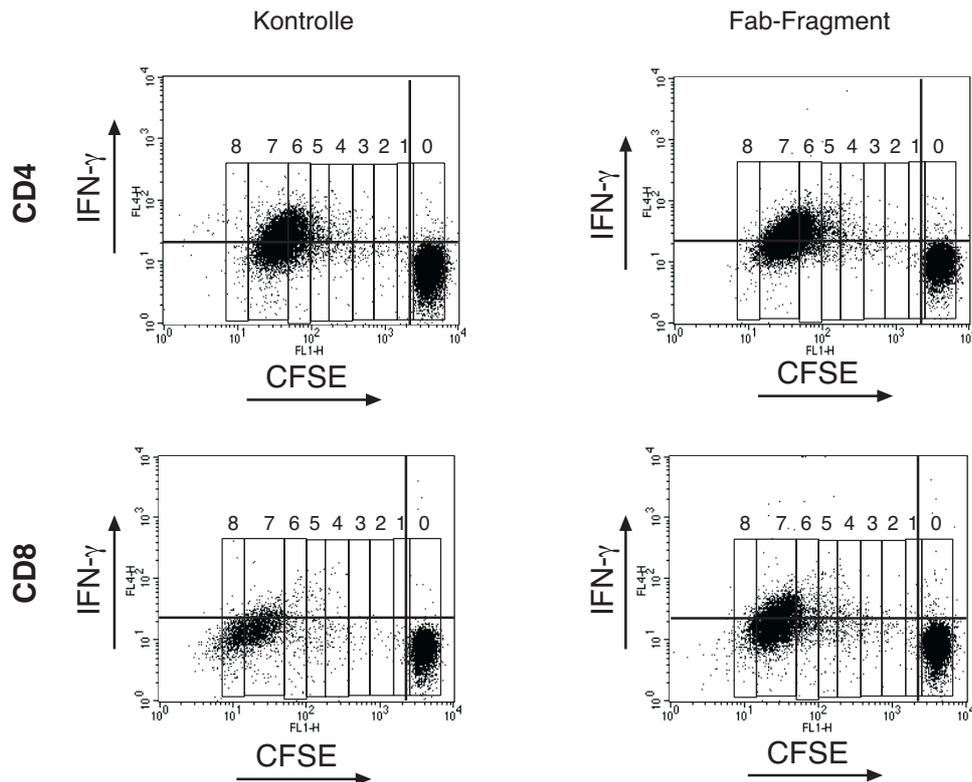


Abb. 3.1.9.1B T-Zellen zeigen eine erhöhte IFN- γ Produktion unter Einfluss des anti-CTLA-4 Fab-Fragmentes. CFSE-markierte T-Zellen wurden für sieben Tage mit SkMel B7.2 bzw. SkMel wt (ohne Abb.) inkubiert. Den Zellen war entweder nur Medium (Kontrolle) oder 10 μ g/ml anti CTLA-4-Fab-Fragment (Fab-Fragment). Die CD4 und CD8 Zellen wurden anschließend mit dem „DynaL Positiv Isolation Kit“ isoliert, mit anti IFN- γ -bio/Streptavidin Alexa-Fluor 648 gefärbt und im FACS ausgewertet. Eingetragen sind neben den Quadranten die Zellzyklus-Gates, die anzeigen durch wie viel Zellteilungen die T-Zellen gelaufen sind.

Tabelle 3.1.2 Verstärkte Proliferation und Produktion von Interferon- γ nach einer Blockade von CTLA-4. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Population an der Gesamtanzahl der ausgewerteten Zellen wieder. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gemessenen Zellen wieder.

Quadrant	Unten rechts	Oben rechts	Unten links	Oben links
	Keine Proliferation Kein Interferon- γ	Keine Proliferation Interferon- γ	Proliferation Kein Interferon- γ	Proliferation Interferon- γ
CD4 (20000)	44,77 (7857)	0,23 (41)	32,07 (5628)	22,93 (4025)
CD4 Fab (20000)	36,60 (6288)	0,33 (57)	29,53 (5073)	33,53 (5760)
CD8 (10410)	57,24 (3888)	0,19 (13)	36,29 (2465)	6,27 (426)
CD8 Fab (17070)	43,95 (6282)	0,37 (53)	39,09 (5587)	16,59 (2371)

3.1.10 T-Zellen werden durch Stimulation mit Wildtyp Melanomzellen nicht anerg

Naive T-Zellen, die nur ein Signal über den T-Zellrezeptor und kein zusätzliches kostimulatorisches Signal über CD80 oder CD86 erhalten, werden nicht aktiviert, sondern reagieren, indem sie in einen Zustand der Anergie übergehen. Dies führt dazu, dass die Zellen auch bei einer anschließenden Stimulation mit Antigen und Kostimulation nicht mehr in der Lage sind, aktiv zu werden. Entsprechend sollten Zellen, die nur durch die SkMel Wildtyp-Zellen stimuliert worden sind und keine Kostimulation bekommen haben, auf eine Restimulation mit B7.2 nicht mehr mit Proliferation reagieren können.

Eine Überlegung war nun, ob möglicherweise eine Blockade mit anti-CTLA-4-Fab-Fragment eine solche Anergie aufheben kann. Falls diese Blockade T-Zellen aktiviert werden, deren T-Zellrezeptor normalerweise eine zu geringe Affinität hat, um ein vollständiges Aktivierungssignal zu senden, sollten diese Zellen möglicherweise auch nicht anerg werden, da das CTLA-4-vermittelt negative Signal die Zelle abschaltet, ohne sie anerg werden zu lassen. Eine Voraussetzung, um diese Theorie zu überprüfen war, dass die mit SkMel wt stimulierten T-Zellen tatsächlich anerg sind. Abb. 3.1.10.1 zeigt allerdings, dass dies nicht der Fall war. Diese T-Zellen ließen sich bei einer Restimulation mit SkMel B7.2 im gleichen Maße zur Proliferation bewegen wie T-Zellen, die zum ersten Mal Kontakt mit SkMel B7.2 hatten.

Für dieses Experiment wurden T-Zellen wie unter 2.6 beschrieben isoliert und für sieben Tage mit SkMel wt oder ohne Stimulation d.h. nur mit Medium inkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen aus beiden Gruppen mit SkMel wt oder B7.2 (re)stimuliert und für weitere sieben Tage inkubiert. Die Auswertung erfolgte dann durch Bestimmung des ³H-Thymidin-Einbaus bzw. im FACS. Eine PHA-Kontrolle zeigte, dass Zellen aus beiden Gruppen prinzipiell in der Lage sind, auf einen Stimulus über den TCR zu reagieren (ohne Abb.). Die Zellen, die für die ersten sieben Tage nur mit Medium inkubiert wurden, dienten als Positivkontrolle und zeigten ein Proliferationsmuster, wie es zu erwarten war: Bei Kontakt mit SkMel wt kam es zu keiner Proliferation, auf die SkMel B7.2 reagierten die T-Zellen mit starker Proliferation. Auch hier konnte das anti CTLA-4 Fab-Fragment die Proliferation noch mal verstärken (Abb. 3.1.10.1 A und B, die beiden linken Balken). Die Zellen, die sieben Tage mit SkMel wt inkubiert wurden, reagierten auch bei der Restimulation mit SkMel wt nicht mit einer Aktivierung, was aber auch nicht anders zu erwarten war, da weiterhin ein kostimulatorisches Signal fehlte (Abb. 3.1.10.1 A die beiden rechten Balken). Allerdings wurden die T-Zellen bei Kontakt mit SkMel B7.2 ähnlich stark aktiviert wie bei der Primärstimulation mit den B7.2-Transfektanten. Auch diese Aktivierung ließ sich wiederum durch anti CTLA-4 Fab-Fragment verstärken (Abb. 3.1.10.1 rechts, die schwarzen Balken). Die Zellen waren durch den alleinigen allogenen Kontakt ohne Kostimulation nicht anerg geworden. Der Versuch wurde zweimal mit gleichem Ausgang wiederholt.

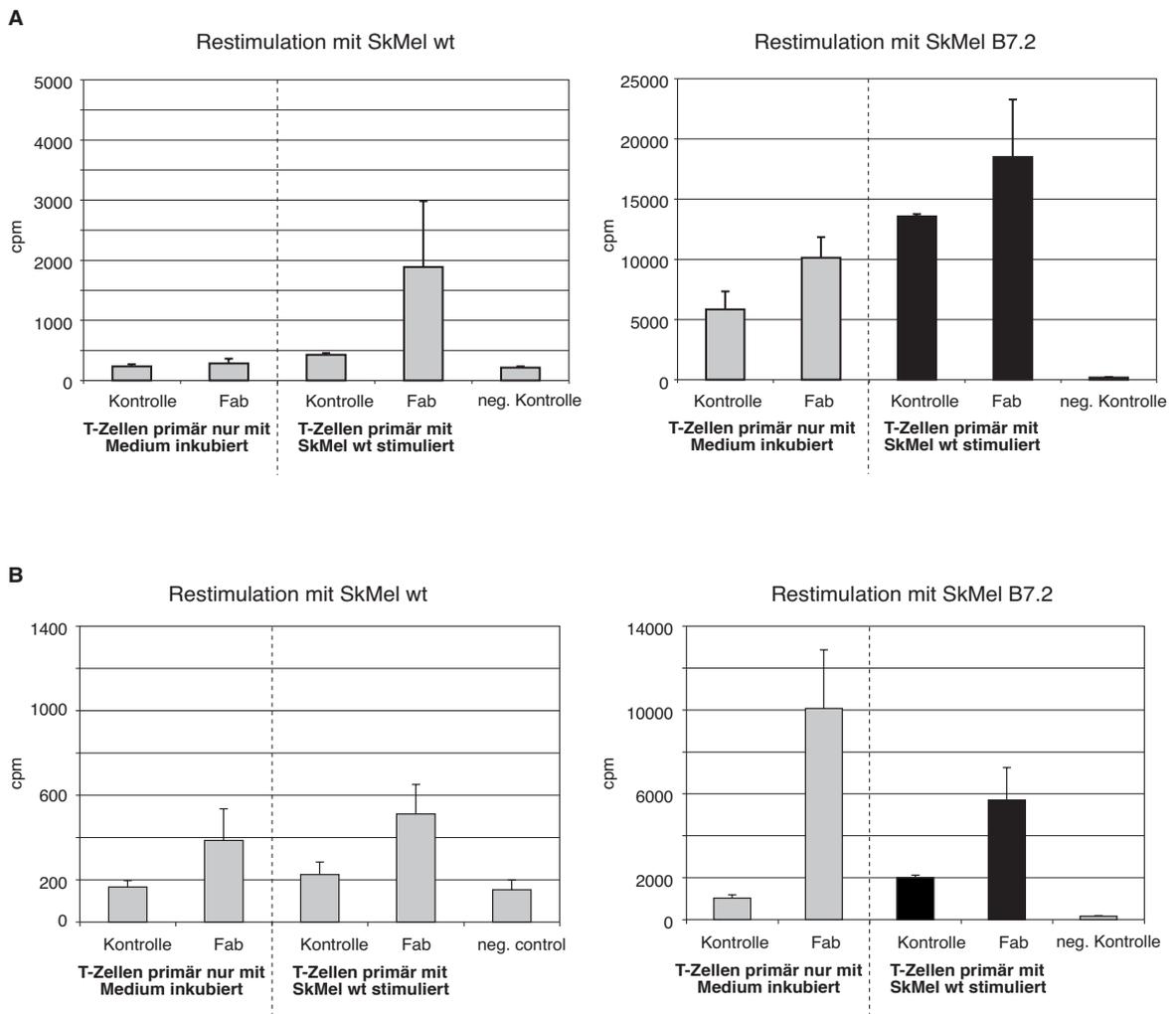


Abb. 3.1.10.1 T-Zellen werden nach der Stimulation mit SkMel wt nicht anerg. Die T-Zellen wurden für sieben Tage mit Medium alleine (Medium) oder SkMel wt (wt) stimuliert. Anschließend wurden diese T-Zellen entweder mit SkMel wt oder SkMel B7.2 restimuliert. Während der Restimulation wurde dort wo Fab steht das CTLA-4 durch anti-CTLA-4-Fab-Fragment blockiert. Die schwarzen Balken symbolisieren die Zellen, die mit SkMel wt primär stimuliert wurden und die entgegen der Erwartung nicht anerg geworden sind, sondern auf eine Restimulation durch SkMel B7.2 mit starker Proliferation reagierten. A und B zeigt die Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit T-Zellen von verschiedenen Spendern.

3.2 Das Proliferationsmuster humaner T-Zellen ist unabhängig von der Kostimulation

3.2.1 Die Titration der Stärke Kostimulation hat keinen Einfluss auf die Kinetik der Proliferation

In den Ergebnissen der Abschnitte 3.1.7 und 3.1.8 hat es den Eindruck, als würden die T-Zellen synchron auf den Stimulus reagieren und einmal aktiviert, eine Reihe von Zellzyklen durchlaufen. Dies steht im Widerspruch zu der Überlegung und den Daten, die im murinen System generiert wurden und besagen, dass ein schwacher Stimulus zwar die gleiche Anzahl an T-Zellen aktiviert wie ein starker Stimulus, diese dann aber weniger Zellzyklen durchlaufen. Für murine CD8⁺-T-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Aktivierung dazu führt, dass die Zellen sich auch dann mehrfach teilen, auch wenn das Antigen und damit Signal 1 entfernt wird (van Stipdonk et al., 2001).

Die Antigenmenge ließ sich in dem hier verwendeten System nicht verändern, aber durch die Titration der SkMel B7.2 in die SkMel wt ließ sich die Menge der Kostimulation variieren. Dabei sollte überprüft werden, ob eine geringe Menge an Kostimulation evtl. zu einer veränderten Kinetik führt. Wie in Abb. 3.1.6.2.1 zu sehen ist, führte eine Abnahme der Kostimulation auch zu einer schwächeren Proliferation. Ein Wiederholung dieses Versuches mit CFSE-markierten T-Zellen zeigte, dass die Anzahl der proliferierenden Zellen insgesamt abnimmt, wenn nur 5% der SkMel mit B7.2 transfiziert sind. Diese wenigen Zellen haben aber das gleiche Proliferationsmuster wie Zellen, die mit 100% SkMel B7.2 aktiviert wurden (Abb. 3.2.1). Auffällig ist auch hier, dass alle T-Zellen, die einmal aktiviert wurden, mindestens fünf Zellzyklen durchliefen. Es hat den Anschein als existiert eine Art Programm, welches die Zellen nach der Aktivierung startet und das unabhängig von der Stärke der Kostimulation zu einer Reihe von Zellteilungen führt. Dieser Befund gilt sowohl für CD8⁺- als auch für CD4⁺-T-Zellen. Dies ist insofern von Bedeutung, da es bei murinen Milzzellen offensichtlich Unterschiede im Verhalten von CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen gibt (Foulds et al., 2002).

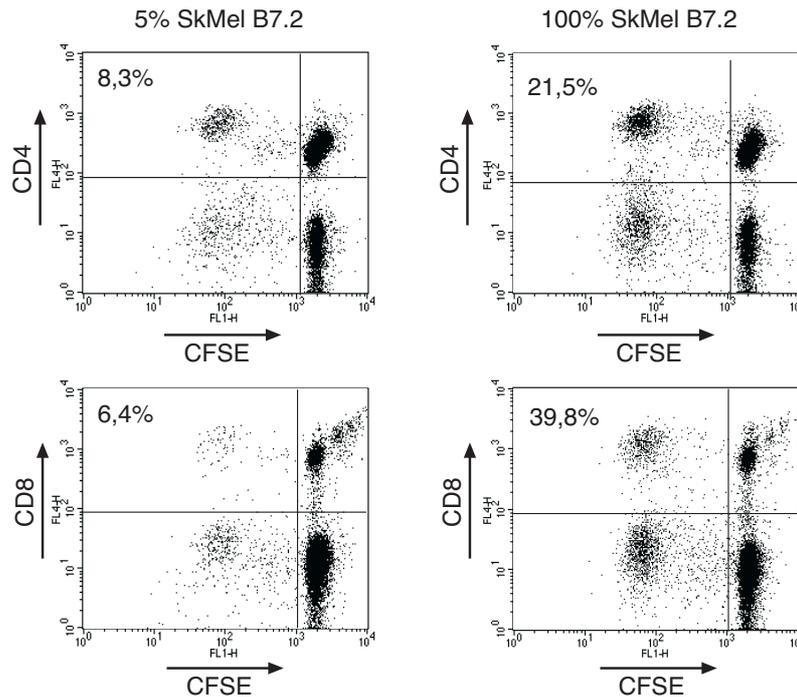


Abb. 3.2.1.1 Kinetik der Proliferation ist unabhängig von der Quantität der Kostimulation. Die SkMel B7.2 wurden entweder als alleinige Stimulatorzellen (100% SkMel B7.2) eingesetzt, oder nur 5% der Stimulatorzellen exprimierten B7.2 und die restlichen 95% sind SkMel wt (5% SkMel B7.2). Die CFSE-markierten T-Zellen wurden für sieben Tage mit den SkMel inkubiert und anschließend mit anti CD4-Cy5 bzw. anti CD8-Cy5 gefärbt und im FACS ausgewertet. Die Prozentzahlen geben den Anteil der proliferierenden CD4 bzw. CD8 Zellen an der Gesamtmenge der CD4 bzw. CD8+-T-Zellen wieder.

3.2.2 Die Blockade der Kostimulation hat keinen Einfluss auf die Kinetik

Die Ergebnisse in Abb. 3.2.1 zeigen zwar, dass das Proliferationsmuster der Aktivierung unabhängig von der Menge der Kostimulation ist, doch erhält eine T-Zelle, die Kontakt mit einer der wenigen B7.2 transfizierten Stimulatorzellen hat, vermutlich eine optimale Kostimulation. Sieht das Ergebnis möglicherweise anders aus, wenn durch Zugabe von CTLA-4-Ig die Kostimulation für alle T-Zellen gleichmäßig blockiert wird? Denkbar ist, dass eine Blockade der Kostimulation durch CTLA-4-Ig dazu führt, dass zwar zu Beginn genauso viele Zellen aktiviert werden, wie bei einer normalen Stimulation mit SkMel B7.2, diese Zellen aufgrund mangelnder Kostimulation aber nur ein oder zwei Zellteilungen durchlaufen. In Abb. 3.2.2.1 ist der Unterschied in der Limitierung der Kostimulation anhand einer einfachen Grafik dargestellt.

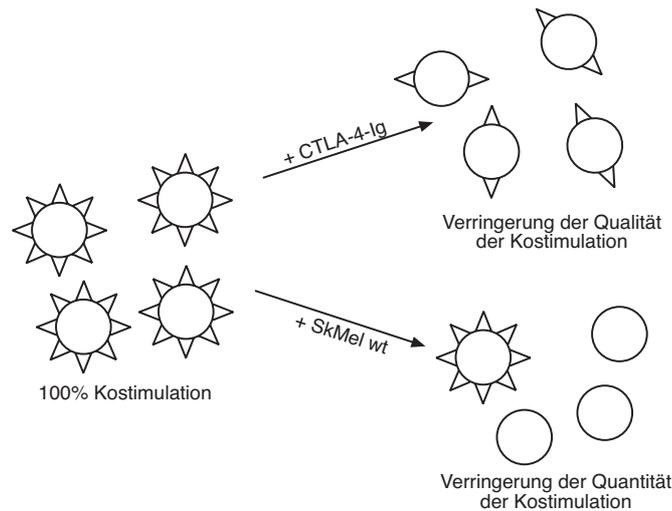


Abb. 3.2.2.1 Limitierung der Qualität oder Quantität der Kostimulation. Die optimale Kostimulation durch 100% SkMel B7.2 (100% Kostimulation) wird durch die Zugabe von CTLA-4-Ig auf allen Zellen gleichmässig reduziert, was zu einer verringerten Qualität der Kostimulation führt, oder die SkMel B7.2 und damit die Kostimulation wird durch die Zugabe von SkMel wt ausgedünnt und so die Quantität der Kostimulation verringert.

Für dieses Experiment wurden die gereinigten T-Zellen mit CFSE markiert und, wie schon in Abb. 3.2.1.1, mit steigender Konzentration SkMel B7.2 stimuliert (Abb. 3.2.2.2 oben rechts). Parallel wurden die T-Zellen ausschließlich mit SkMel B7.2 stimuliert und die Kostimulation durch eine steigende Konzentration von CTLA-4-Ig blockiert (Abb. 3.2.2.2 oben links). Zuerst wurde die Proliferation bei beiden Experimenten durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Gesucht wurde danach nach einer CTLA-4-Ig-Konzentration und einer Konzentration von SkMel B7.2 in SkMel wt, bei denen die Menge an eingebautem Thymidin ungefähr gleich war. Bei $2,5 \mu\text{g/ml}$ CTLA-4-Ig und bei 5% SkMel B7.2 lagen beide Werte etwas über 2000 cpm. Eine Auswertung im FACS sollte nun anhand der Ausdünnung des CFSE zeigen, ob die T-Zellen das gleiche oder ein unterschiedliches Proliferationsmuster haben. In Abb. 3.2.2.2 unten links ist die maximale Proliferation bei einer Stimulation mit 100% SkMel B7.2 ohne CTLA-4-Ig zu sehen. Es ist deutlich sichtbar, dass fast alle einmal aktivierten CD4^+ -T-Zellen mindestens sechs Zellteilungen durchlaufen haben. Vergleicht man damit jetzt die FACS-Auswertungen der Stimulation mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ CTLA-4-Ig (unten Mitte) und die der Stimulation mit nur 5% SkMel B7.2 (unten rechts) zeigt sich, dass diese praktisch identisch sind. Es machte also keinen Unterschied, ob die Kostimulation ausgedünnt oder gleichmäßig blockiert wurde, sobald die T-Zellen einmal ihre Aktivierungsschwelle überschritten, fingen sie an zu proliferieren und durchliefen die nächsten fünf bis acht Zellzyklen unabhängig von der Kostimulation.

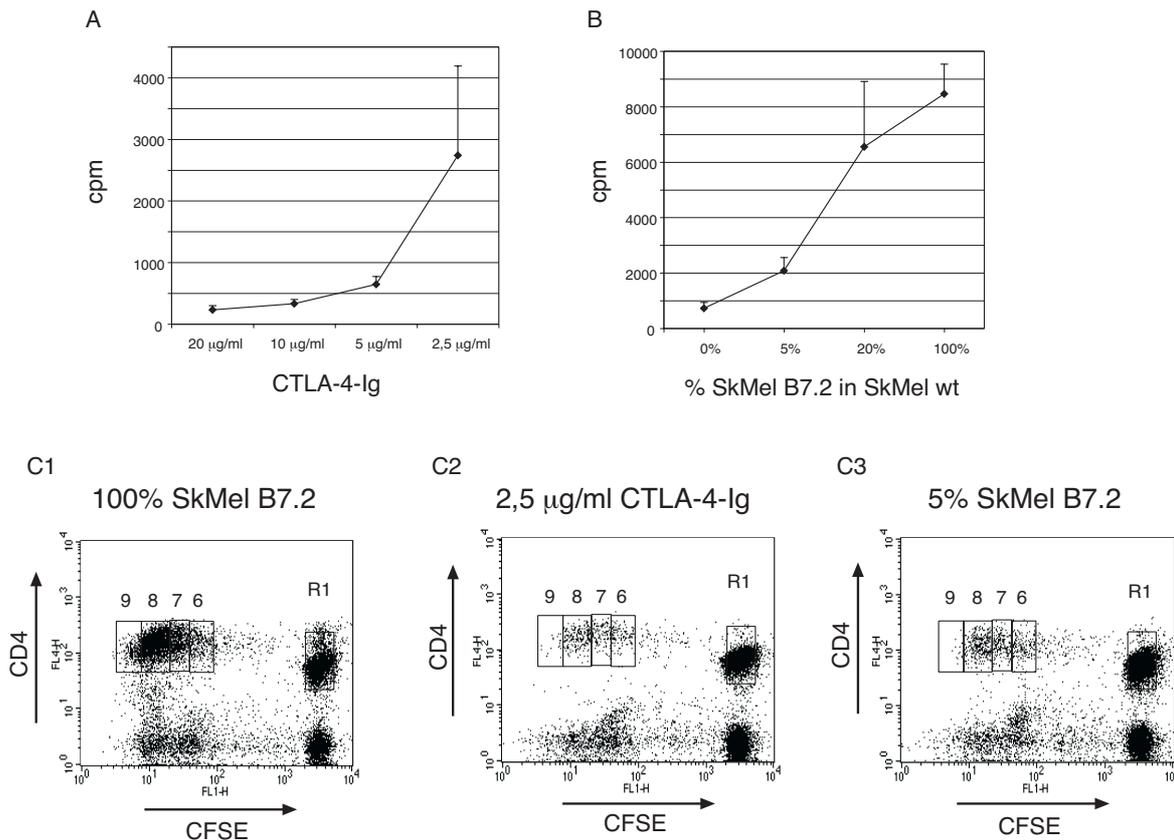


Abb. 3.2.2.2 Die Art der Blockade der Kostimulation beeinflusst die Kinetik der Proliferation nicht. $1 \cdot 10^5$ CFSE-markierte T-Zellen wurden für sieben Tage mit $5 \cdot 10^4$ SkMel stimuliert. Die Zellen wurden entweder mit steigenden Mengen an CTLA-4-Ig inkubiert (A) oder die Menge der SkMel B7.2-Zellen wurde durch Zugabe von SkMel wt ausgedünnt (B). Die Stärke der Proliferation wurde dann durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Bei der 2,5 µg/ml CTLA-4-Ig und 5% SkMel B7.2 wurde ungefähr die gleiche Menge ^3H -Thymidin eingebaut. Von diesen Proben wurde in einer FACS-Analyse mit CFSE-markierten T-Zellen untersucht, ob die Kinetiken im Vergleich zu einer Probe mit 100% SkMel B7.2 (C1) und untereinander unterschiedlich waren. Für die FACS-Auswertung wurden die Zellen aus drei Ansätzen vereinigt und mit anti-CD4-Cy5 gefärbt. Die Gates zeigen die T-Zellen, die sich zwischen sechs und neun mal geteilt haben.

3.2.3 Die Blockade der Kostimulation durch CTLA-4-Ig nach 24 Stunden führt zu keinem Abbruch der Proliferation

Um die These zu stützen, dass die T-Zellen nach Erreichen ihrer Aktivierungsschwelle unabhängig von der Kostimulation durch B7 sind, sollte die Kostimulation zu verschiedenen Zeitpunkten blockiert werden. CFSE-markierte T-Zellen wurden für insgesamt sieben Tage mit SkMel B7.2 inkubiert. Nach 0, 12, 24 und 36 Stunden und wurde CTLA-4-Ig in einer finalen Konzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ zu den Zellen gegeben (siehe Abb. 3.2.3.1). Eine Menge, die normalerweise ausreicht, um eine Kostimulations-abhängige Aktivierung von T-Zellen zu verhindern. Für die Auswertung wurden die Zellen mit anti-CD3-Cy5 gefärbt und im FACS ausgewertet. Als Positivkontrolle wurden Zellen ausgewertet, denen überhaupt kein CTLA-4-Ig zugesetzt war. Hier befanden sich nach sieben Tagen 31% der CD3-positiven Zellen in der Proliferation. Es zeigte sich, dass eine Blockade der Kostimulation von Anfang die Proliferation der T-Zellen fast vollständig unterdrückt. Nur sechs

Prozent der CD3-positiven Zellen befanden sich am siebten Tag in der Proliferation. Die Zugabe von CTLA-4-Ig nach 12 Stunden führt zu einer Proliferation von 23% der T-Zellen. Der Versuch, die Kostimulation nach 24 Stunden zu blockieren und damit eine Aktivierung der T-Zellen zu verhindern, schlug fehl. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen schon so weit aktiviert, dass nach sieben Tagen der gleiche Prozentsatz an CD3-Zellen in der Proliferation war, wie ohne CTLA-4-Ig. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich in den ersten 24 Stunden entscheidet, ob eine T-Zelle aktiviert wird oder nicht. Reicht die Signalstärke der Kostimulation aus, um die Aktivierungsschwelle zu überschreiten, durchlaufen die Zellen die nächsten Zellzyklen unabhängig von jeglicher Kostimulation.

Zugabe von CTLA-4-Ig nach:

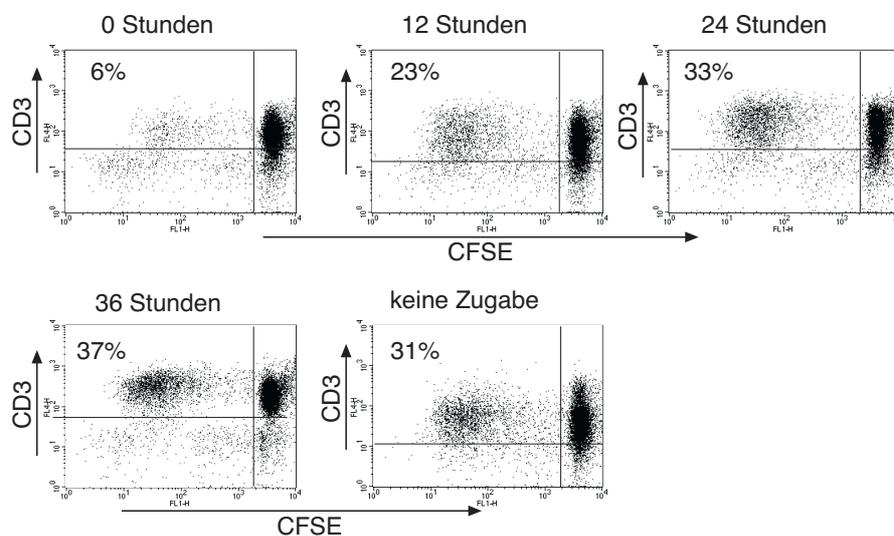


Abb. 3.2.3.1 Blockade der Proliferation durch Zugabe von CTLA-4-Ig zu verschiedenen Zeitpunkten. $1 \cdot 10^5$ CFSE-markierte T-Zellen wurden für sieben Tage mit $5 \cdot 10^4$ SkMel B7.2 stimuliert. Die Kostimulation wurde nach 0, 12, 24 und 36 Stunden durch die Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ CTLA-4-Ig blockiert. Für die Auswertung wurden die Zellen aus drei Ansätzen vereinigt und mit anti-CD3-Cy5 gefärbt. Die Zahlen geben den Prozentsatz an proliferierenden CD3-positiven Zellen wieder.

4. Diskussion

4.1 Überblick

Das inhibitorische Molekül CTLA-4 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der T-Zellantwort. Eine Ligation von CTLA-4 mit seinen Liganden B7.1 und B7.2 begrenzt die Proliferation von T-Zellen, kann aber durch ein Anheben der Aktivierungsschwelle auch die initiale Aktivierung der T-Zellen beeinflussen. In murinen Systemen konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von CTLA-4 durch mAk zu einer verstärkten Eliminierung von Tumorzellen führt. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit zu zeigen, dass man entsprechende Mechanismen zur Verstärkung der Immunabwehr auch bei humanen T-Zellen nutzen kann.

In dieser Arbeit ist es gelungen, ein *in vitro* System zur Charakterisierung einer allogenen Immunantwort von humanen T-Zellen gegen Tumorzellen zu etablieren. Die dadurch ausgelöste Proliferation ließ sich durch eine Blockade von CTLA-4 verstärken. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass diese verstärkte Immunantwort vermutlich auf eine vermehrte Rekrutierung von T-Zellen zurückzuführen ist.

4.2 Allogene Stimulation und das *in vitro* Testsystem

Eine Aktivierung und Proliferation der T-Zellen wurde nur dann erreicht, wenn die Zellen mit B7.2 transfizierten SkMel stimuliert wurden. Wurden die SkMel wt als Stimulatoren eingesetzt, ließ sich hingegen kaum eine Proliferation beobachten, wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wird. Da sich die Proliferation nach der Stimulation mit SkMel B7.2 durch CTLA-4-Ig blockieren ließ (siehe Abb. 3.2.3.1), liefert das B7-Molekül das entscheidende kostimulatorische Signal.

Der proliferationssteigernde Effekt der Kostimulation durch B7 war am deutlichsten unter folgenden Bedingungen: Für die Tests wurden Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen und Flachboden verwendet, denn bei Rundbodenplatten kamen alle Effektorzellen in der Mitte zu liegen, während die adhärenen Tumorzellen an der Seitenwand hafteten. Ein weiterer Vorteil der Flachbodenplatten war, dass sich die Zellen wesentlich besser durch das Mikroskop beobachten ließen, was für die Beurteilung der Versuche z.T. sehr wichtig war. Die Melanomzellen wurden mit 30 Gy bestrahlt und in einer Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen je Vertiefung eingesetzt. Das Bestrahlen mit γ -Strahlen war notwendig, da es die Proliferation der SkMel Zell-Linien verhinderte. Deren eigenes stärkeres Wachstum hätte sonst die Proliferation der T-Zellen überlagert. Bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen je Vertiefung bildeten die SkMel-Zellen einen dichten Zellrasen, der den T-Zellen einen ständigen Kontakt mit den Melanomzellen ermöglichte. Wurden zu wenig SkMel eingesetzt, reichte der Kontakt der T-Zellen mit den SkMel nicht aus, um sie ausreichend zu stimulieren, obwohl die T-Zellen sich möglicherweise auch aktiv auf dem Boden der Zellkulturschalen bewegen. Aber eine zu hohe Anzahl an SkMel hatte ebenfalls zur Folge, dass die T-Zellen nicht mehr optimal proliferierten (siehe Abb. 3.1.4.3). Da die SkMel durch die Bestrahlung nicht getötet, sondern nur an der Zellteilung gehindert wurden, be-

trieben sie weiter Stoffwechsel. Wahrscheinlich verbrauchten sie soviel Nährstoffe aus dem Medium, dass dies für die T-Zellen limitierend wirkte.

Der Verbrauch von Nährstoffen im Medium war auch ein Grund, warum die Versuche spätestens am siebten Tag ausgewertet wurden. Bei Auswertung nach drei bzw. fünf Tagen waren, wie auch in Abb. 3.1.7.2-4 zu sehen ist, keine oder nur sehr wenige Zellen in der Proliferation. Bei einer Versuchsdauer von mehr als sieben Tage war zu befürchten, dass ein Teil der T-Zellen entweder durch Aktivierungsinduzierten-Zelltod stirbt oder an einen Mangel an Nährstoffen zu Grunde geht.

Es wurden nur frisch aufgereinigte T-Zellen verwendet, da das Einfrieren und Auftauen die Zellen möglicherweise schädigt. Ein Nachteil bestand dann allerdings darin, dass die verwendeten T-Zellen jedesmal von einem anderen Spender stammten und diese sich auch jedesmal unterschiedlich verhielten. Dies hatte zur Folge, dass bei gleicher Zellzahl die T-Zellen eines Experiment massiv proliferierten, beim nächsten hingegen kaum oder gar kein Thymidineinbau bzw. Proliferation im FACS gemessen wurde. Die Ergebnisse der einzelnen Tests sind also nicht vergleichbar, was die absoluten Werte angeht. Vergleichbar sind nur die relativen Werte der Stimulation zueinander (siehe auch 4.5).

Eine Zellkonzentrationen von $1 \cdot 10^5$ T-Zellen je Vertiefung war ausreichend, um bei den meisten Spendern eine optimale Stimulation mit starker Proliferation auszulösen (3.2.4). Zu hohe Konzentrationen an T-Zellen in einer Vertiefung führten zu einer hohen, Kostimulus-unabhängigen Stimulation. Wahrscheinlich waren dann trotz hoher Reinheit der T-Zellen ausreichend professionelle APC (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) vorhanden, die Zellfragmente von abgestorbenen Melanomzellen aufnehmen konnten. Diese APC konnten dann Antigene präsentieren und T-Zellen aktivieren (siehe auch 4.6). Außerdem könnten bei hoher Konzentration auch die durch IL-2 aktivierten NK-Zellen zur Proliferation beitragen.

4.3 Markierung der T-Zellen mit CFSE

Durch den Einbau von ^3H -Thymidin lässt sich zwar erkennen, ob Zellen sich in der Proliferation befinden, Aussagen lassen sich aber nur über die gesamte Zellpopulation machen. Durch das Markieren der T-Zellen mit CFSE ergibt sich nun die Möglichkeit, die Proliferation auf Einzelzellebene zu analysieren. Es lässt sich so nicht nur erkennen, ob die Zellen proliferieren, sondern die Proliferation lässt sich auch besser analysieren, da die Auswertung durch das FACS erkennen lässt, wieviele Zellen sich wie häufig geteilt haben. Außerdem lassen sich durch Doppel- und Dreifachfärbungen noch weitere Parameter der Zellen bestimmen so z.B. welche Subpopulation der T-Zellen sich teilt. Ein möglicher Nachteil der Methode ist, dass durch die irreversible Bindung des CFSE durch Amidbindungen von intrazellulären Proteinen diese Proteine in ihrer Funktion behindert werden. Es hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass in den Proliferationsassays, die mit der gleichen Anzahl sowohl mit CFSE-markierten als auch unmarkierten T-Zellen von dem gleichen Spender durchgeführt wurden, der Einbau von ^3H -Thymidin bei CFSE-markierten T-Zellen deutlich schwächer ausfiel. (ohne Abb.)

4.4 Werden Memory oder naive T-Zellen aktiviert?

Die Tatsache, dass die T-Zellen durch die Blockade von CTLA-4 verstärkt aktiviert werden konnten (siehe Abb. 3.1.6.1), ohne dass CTLA-4 auf naiven Zellen in signifikanten Mengen nachweisbar ist (Vandenborre et al., 1999) führt zu der Frage, ob in dem in dieser Arbeit verwendeten System naive oder vielleicht doch Memory T-Zellen stimuliert wurden. Es ist denkbar, dass es zu einer Aktivierung von beiden T-Zellen-Populationen gekommen ist. Gegen diese Vermutung spricht allerdings, dass es bei allen Versuchen mit CFSE-markierten T-Zellen die Kinetik der Proliferation innerhalb des entsprechenden Experiments gleich war (siehe 3.1.7.2.4 und 3.1.7.2.5). Es wäre aber zu erwarten, dass Memory-Zellen schneller aktiviert werden als naive Zellen und man deshalb zwei in ihrer Kinetik unterschiedliche Population bei der FACS-Analyse der CFSE-markierten T-Zellen hätte sehen müssen (Iezzi et al., 1998). Eine „echte“ Memory-Antwort gegen ein Alloantigen ist bei den meisten Menschen eher unwahrscheinlich, da ihre T-Zellen kaum in den Kontakt mit dem Gewebe anderer Menschen gekommen sind. Da sich die Alloantwort sowohl gegen das Peptid, als auch das Allo-MHC-Molekül oder die entsprechende Kombination richten kann, ist es denkbar, dass eine Kreuzreaktivität auch Memory T-Zellen aktivieren kann. Ein Merkmal von Memory T-Zellen ist jedoch, dass ihre Aktivierung praktisch unabhängig von einer Kostimulation durch B7 ist (Croft et al., 1994). In dieser Arbeit wurden die SkMel Wildtypzellen, die kein B7.1 oder B7.2 exprimieren jedesmal als Kontrolle eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass durch diese Zellen eine wesentlich schwächere oder gar keine Proliferation ausgelöst wurde (Abb. 3.1.4.2 und 3.1.7.2.4), die dann aber wiederum die gleiche Kinetik zeigte wie bei T-Zellen, die durch die SkMel B7.2 stimuliert wurden.

Auch wenn vieles für die Aktivierung von naiven T-Zellen spricht, so lässt sich dieser Punkt ohne eine Auftrennung der Zellen in naive und Memory T-Zellen nicht klären. Deshalb ist in dieser Arbeit der Ausdruck „ruhende“ T-Zellen für die aus dem Buffy Coat isolierten T-Zellen verwendet worden. Falls diese Zellen tatsächlich nicht naiv waren, so waren sie nicht so weit aktiviert, dass sie ohne einen B7-abhängigen Stimulus proliferieren konnten (3.1.4.2).

4.5 Warum kommt es z.T. zu keiner Aktivierung?

Die Verwendung von frischen Lymphozyten und damit von jeweils anderen Spendern hatte erwartungsgemäß zur Folge, dass die Proliferation jedesmal unterschiedlich ausfiel. Trotzdem ist es erstaunlich, dass bei einer Reihe von Versuchen, d.h. mehr als 6 von über 30 Versuchen, überhaupt keine Proliferation messbar war. Dies könnte mehrere Ursachen haben: Da es sich um eine allogene Stimulation handelt, ist es zumindest denkbar, dass der (unbekannte) Spender und die SkMel-Zellen in ihren MHC-Molekülen zu gut übereinstimmen, sodass praktisch keine Immunantwort ausgelöst wurde. Die Unterschiede im Haplotyp der Spender dürften auch erklären, warum bei den Experimenten das Verhältnis der aktivierten CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen zueinander jedesmal unterschiedlich war. Die SkMel besitzen den MHC-I Haplotyp HLA-A*0201 (de Ines et al., 1999). Stimmt dieser Haplotyp mit dem des (unbekannten) Spenders sehr gut überein, werden die CD8⁺ T-Zellen kaum stimulierbar sein. Trotzdem könnten die CD4⁺ T-Zellen sehr gut auf die

SkMel reagieren.

Hinzu kommt, dass das in dieser Arbeit verwendete *in vitro* System zwar künstliche APC in Form von B7.2 transfizierten SkMel bereitstellt, dies jedoch von der optimalen Situation *in vivo* z.B. im Lymphknoten weit entfernt ist. So können dendritischen Zellen und andere professionelle APC Antigen weitaus besser präsentieren und sezernieren außerdem Zytokine, die die T-Zellen zusätzlich aktivieren. Unter den *in vitro* Bedingungen ist möglicherweise eine kritische Anzahl von T-Zellen erforderlich, die aktiviert werden müssen, damit u.a. die IL-2 Konzentration hoch genug ist, um die T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Eine Abschätzung der Anzahl an ruhenden T-Zellen, die unter normalen Bedingungen von den SkMel B7.2 aktiviert werden zeigt, einen Anteil von etwa 0,17 - 0,6% (Tab. 3.1.1). Möglicherweise ist die Aktivierung von etwa jeder sechshundertsten Zelle die Untergrenze, die unter diesen *in vitro* Bedingungen noch ausreichend ist, um insgesamt, bei den durch das Allogen potentiell stimulierbaren T-Zellen, die Zellteilung einzuleiten.

Es wäre auch denkbar, dass die Zellen beim Aufreinigen so geschädigt wurden, dass sie zwar überlebten, aber nicht mehr in der Lage waren, auf einen allogenen Stimulus zu proliferieren. Dagegen spricht, dass bei all diesen Versuchen die Zellen auf die Stimulation mit PHA mit einer starken Proliferation reagiert haben. Dies zeigt, dass sie in der Lage sind, zumindest auf ein mitogenes Signal hin zu proliferieren. Wenn die T-Zellen auf den allogenen Stimulus der SkMel überhaupt nicht reagierten, konnte auch die Blockade von CTLA-4 durch das Fab-Fragment die T-Zellen nicht zur Proliferation bewegen (siehe Tab. 3.1). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die verstärkte Proliferation nach einer Zugabe des Anti-CTLA-4-Fab-Fragments, wie sie u.a. in Abb. 3.1.6.1 gezeigt wird, nicht auf eine Kontamination der Fab-Fragmente mit einem mitogenen Substrat wie z.B. LPS zurückzuführen ist. Wäre eine solche Kontamination Ursache der verstärkten Proliferation der T-Zellen, hätte diese im gleichen Maße dort sichtbar sein sollen, wo die T-Zellen nur mit SkMel wt und dem Fab-Fragment inkubiert wurden oder auch dann die T-Zellen aktivieren sollen, wenn sie durch die SkMel nicht stimuliert wurden (siehe Abschnitt 3.1.5). Bei der Aufreinigung des Fab-Fragments wurde eine Protein-G-Säule eingesetzt (siehe 2.7.1). Da dieses rekombinante Protein-G aus den Gram-negativen *E. coli* stammt, ist es immerhin denkbar, dass es hier zu einer Kontamination mit bakteriellen Endotoxinen kommt. Gegen eine Kontamination mit LPS spricht aber außerdem, dass aufgereinigte humane T-Zellen, wie sie in dieser Arbeit benutzt wurden, durch LPS nicht direkt aktivierbar sind, sondern auf den Kontakt mit Monozyten angewiesen sind (Mattern et al., 1994). Trotzdem lässt sich ein Einfluss von anderen bakteriellen Toxinen nicht gänzlich ausschließen, da diese möglicherweise nur in Synergie mit einem B7-abhängigen Signal wirken. Unter anderem aus diesem Grund wurde aus einem weiteren Antikörper (UPC10) Fab-Fragment hergestellt und als Kontrolle eingesetzt (siehe auch 4.8.3).

4.6 Aktivierung von T-Zellen durch SkMel Wildtyp

Obwohl bei einer Stimulation mit SkMel wt eigentlich keine Kostimulation durch B7 gegeben wird, wurden doch immer einige T-Zellen aktiviert (3.1.4). Diese Aktivierung hat die gleiche Kinetik wie eine Aktivierung durch B7.2 (Abb. 3.1.7.4 und 3.1.7.5). Dies spricht dagegen, dass es sich bei den proliferierenden T-Zellen um eine andere Subpopulation handelt oder dass die Zellen durch andere Mechanismen stimuliert werden (siehe auch 4.4). Würde es sich bei dieser Aktivierung um eine B7-unabhängige Memory-Antwort handeln, sollte die Aktivierung deutlich schneller erfolgen als bei einer Aktivierung, die von Kostimulation abhängig ist.

Möglicherweise wird diese Stimulation durch eine sehr geringe Anzahl kontaminierender APC ausgelöst, die trotz der mehrstufigen Aufreinigung der T-Zellen nicht entfernt wurden. Diese APC z.B., dendritische Zellen, wären dann in der Lage, Antigen von sterbenden SkMel aufzunehmen und den T-Zellen zusammen mit B7 zu präsentieren. Durch einen „cross-priming“ genannten Mechanismus sind die DC auch in der Lage, externes Antigen in den MHCI-Weg zu schleusen und den CD8⁺-T-Zellen zu präsentieren (Huang et al., 1994; Heath and Carbone, 2001). Eine weitere Quelle für B7-Kostimulation könnten die T-Zellen selbst sein. Diese exprimieren auf ihrer Oberfläche eine sehr geringe Menge an sowohl CD86 als auch nach Aktivierung CD80 (Prabhu Das et al., 1995; Wolthers et al., 1996), wobei es vor allem Memory T-Zellen sind, die CD86 exprimieren (Jeannin et al., 1999). In diesem Fall würde die zu aktivierende T-Zelle von der SkMel wt das allogene Signal erhalten und von einer anderen T-Zelle das kostimulatorische Signal. Dass eine *trans*-Kostimulation zu einer Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen führen kann, haben u.a. Smythe et al. ebenfalls in einem allogenen System gezeigt (Smythe et al., 1999).

4.7 Verbesserungen des Testsystems

Vor allem durch die unterschiedlichen Spender ist das in dieser Arbeit verwendete System schwer zu kontrollieren und die Ergebnisse waren dadurch starken Schwankungen unterworfen. Es wäre zu überlegen, wie es gelingen könnte, die T-Zellen in einem humanem System zu stimulieren, bei dem die Parameter wie z.B. die Variabilität des Spenderblutes besser kontrolliert und/oder konstant gehalten werden können. Eine Idee war, die T-Zellen oder die PBL der Spender in flüssigen Stickstoff einzufrieren, damit man eine Zeit lang mit den gleichen T-Zellen arbeiten konnte. Es hat sich aber in vorangegangenen Arbeiten gezeigt, dass auch das Einfrieren die Zellen so schädigte, dass nicht von gleichen Versuchsbedingungen auszugehen war. Es ist recht schwierig ein humanes *in vitro* System aufzubauen, welches auf der einen Seite versucht durch die Verwendung von normalen PBL bzw. T-Zellen der physiologischen Situation recht nahe zu kommen und auf der anderen Seite so konstante Ergebnisse liefert, wie man sie eher beim Arbeiten mit T-Zellklonen erhält. Ein Ausweg wäre evtl. eine genaue Bestimmung des MHCI und II-Haplotyps der SkMel-Zellen und der Spender. Dadurch könnte man nur noch die T-Zellen von Spendern eines bestimmten Haplotyps verwenden, der nicht zu stark mit dem der SkMel-Zellen übereinstimmt und dessen T-Zellen sich erfolgreich stimulieren lassen. Diese würde ver-

mutlich die Häufigkeit, mit der diese Versuche durchgeführt werden könnten, stark limitieren, da ein solcher Spender evtl. recht selten erscheint.

4.8 Modulation der Immunantwort durch die Blockade von CTLA-4

4.8.1 Der Antikörper BNI3 bindet spezifisch an humanes CTLA-4

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper ist schon vorher in der Arbeit von Jan Castan et al. charakterisiert worden (Castan et al., 1997), in der u.a. gezeigt wurde, dass der Antikörper BNI3 spezifisch für humanes CTLA-4 ist. Auch die Blockade-Experimente in dieser Arbeit konnten belegen, dass BNI3 bzw. das Fab-Fragment dieses Antikörpers wirklich an CTLA-4 bindet und eine Bindung von CTLA-4-Ig an B7 verhindert (siehe Abb. 3.1.3.1). Dies lässt zudem erkennen, dass die Affinität des Antikörpers groß genug ist, um CTLA-4 aus der recht starken Bindung (Linsley et al., 1994; Schwartz et al., 2001; Stamper et al., 2001) mit dem natürlichen Liganden B7 zu verdrängen. Die Arbeitsgruppe von Wang konnte außerdem zeigen, dass der Antikörper BNI3 das gleiche Epitop erkennt, wie zwei andere Referenzantikörper gegen CTLA-4 (11D4 und 10A8) (Wang et al., 1997).

4.8.2 Gesamtantikörper oder Fab-Fragment

Ein Reihe von Arbeitsgruppen hat den Einfluss von Antikörpern gegen CTLA-4 auf die Proliferation von T-Zellen untersucht. Im murinen System konnte bei antigenspezifischen Immunantworten *in vitro* und *in vivo* eine Steigerung der Proliferation der T-Zellen durch anti-CTLA-4-Ak und anti-CTLA-4-Fab-Fragment gezeigt werden (Krummel et al., 1996; Walunas et al., 1996). Wurden humane T-Zellen *in vitro* durch Antikörper gegen CD28 aktiviert, konnte mit anti-CTLA-4-Ak die Proliferation weiter verstärkt werden (Linsley et al., 1992).

In dieser Arbeit ließ sich allerdings bei antigenspezifischer Stimulation die Proliferation von humanen T-Zellen durch anti-CTLA-4-Gesamtantikörper nicht beeinflussen. Es zeigte sich im Gegenteil tendenziell eine leichte Inhibition der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.1.6.1 und 3.1.7.5). Möglicherweise lässt sich die Proliferation in dieser Arbeit mit Gesamtantikörper gegen CTLA-4 deshalb nicht steigern, weil der bivalente Gesamtantikörper zwar die Bindung von B7 an CTLA-4 blockiert, aber als Agonist die gleichen inhibitorischen Signale auslöst wie eine Bindung an den natürliche Liganden B7. Dies würde den leichten Rückgang der Proliferation erklären, der bei einigen Versuchen beobachtet wurde (Abb. 3.1.6.1). Dass die Kreuzvernetzung von Antikörpern gegen CTLA-4 zu einer Inhibition von humanen T-Zellen führt, haben mehrere Arbeitsgruppen genutzt, um die Wirkung des CTLA-4 zu untersuchen (Walunas et al., 1994; Gribben et al., 1995). Der inhibitorische Effekt fällt in dieser Arbeit sehr gering aus, da die Bivalenz des Antikörpers zu einer geringeren Kreuzvernetzung führt als beispielsweise der Einsatz von immobilisierten Antikörpern. Die inhibitorischen Signale infolge von Kreuzvernetzung lassen sich durch den Einsatz von Fab-Fragment vermeiden. Da diese nur monovalent sind, geht man davon aus, dass sie kein Signal auslösen können und damit keine agonistische

Funktion haben. In dieser Arbeit ließ sich mit den Fab-Fragment tatsächlich die spezifische Immunantwort verstärken (3.1.6 und 3.1.7).

Der Nachteil beim Einsatz von Fab-Fragment ist sicher die technisch aufwändige Herstellung (2.7.1), zumal zusätzlich zu der Aufreinigung und evtl. Beschaffung der Antikörper noch weitere Kosten entstehen. Dadurch ist die Menge des zur Verfügung stehenden Fab-Fragments in dieser Arbeit ein limitierender Faktor gewesen, sodass Versuche, die klären sollten, ob durch die Blockade von CTLA-4 auch die Zytotoxizität der T-Zellen bzw. CD8⁺-T-Zellen gesteigert wird, noch nicht durchgeführt werden konnten. Ein Alternative zu dem Fab-Fragment ist die gentechnische Herstellung von ebenfalls monovalenten Miniantikörpern, sogenannten „single chain Fv-fragments“ (scFv) aus den BNI3-Hybridomzellen (Krebber et al., 1997). Doch auch hier gibt es technische Probleme. Bei einem ersten Versuch scFv's aus dem BNI3-Antikörper herzustellen, ist die Bindungsaktivität an CTLA-4 verloren gegangen (Diplomarbeit C. Pracht 2001). Solche scFv's sind allerdings schon von anderen humanen Antikörpern gegen CTLA-4 hergestellt worden und haben sich als bindungsaktiv erwiesen (Pistillo et al., 2000; Pistillo et al., 2001).

4.8.3 Kein Einfluss durch ein Kontroll Fab-Fragment

Zwar beweist eigentlich die Tatsache, dass auch die Zugabe von anti-CTLA-4-Fab-Fragment die T-Zellen nach einer Stimulation mit SkMel wt nicht zu einer Proliferation anregen kann, dass es sich hierbei um keinen unspezifischen Effekt handelt. Trotzdem ist zur Überprüfung der Spezifität der Verstärkung der Immunantwort durch Fab-Fragment des anti-CTLA-4-Antikörpers BNI3 ein weiteres Fab-Fragment aus einem Kontrollantikörper hergestellt worden. Es handelte sich hierbei ebenfalls um einen murinen IgG2a Antikörper, der das Hapten β -2,6-Fruktosan erkennt. Da Fab-Fragment keinen Fc-Teil mehr besitzen, kann man nicht von einer echten Isotypkontrolle sprechen. Da aber die einfache Zugabe von Antikörpern nicht reicht, um die Immunantwort zu verstärken ließ sich sehr gut dadurch demonstrieren, dass die Zugabe der gleichen Menge Gesamtantikörper BNI3 keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation hatte (siehe Abschnitt 4.8.2 bzw. Abb. 3.16.1 und 3.1.7.5). Durch dieses Kontroll-Fab-Fragment sollte viel mehr überprüft werden, ob eine möglicherweise während der Generierung der Fab-Fragmente in die Probe gelangte Verunreinigung für die Steigerung der Proliferation verantwortlich war (siehe auch 4.5). In Abb. 3.1.7.4.1 sind die Ergebnisse der Versuche mit dem anti-CTLA-4 Fab-Fragment und dem Kontroll-Fab-Fragment zusammengefasst. Hier zeigt sich, dass die Kontroll-Fab-Fragmente die Proliferation im Vergleich zu der Stimulation mit Medium alleine nicht steigern können. Durch die unterschiedlichen Spender schwanken die Ergebnisse zwar recht stark, doch trotzdem lässt sich sagen, dass die gezeigte Steigerung der Proliferation auf einer spezifischen Blockade von CTLA-4 beruht und nicht z.B. auf einem bakteriellen Endotoxin.

4.8.4 Wie verstärkt eine Blockade von CTLA-4 die spezifische Immunantwort?

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie und zu welchem Zeitpunkt eine Blockade von CTLA-4 wirkt. Daraus lässt sich dann auch schlussfolgern, welche Rolle CTLA-4 bei einer normalen Immunantwort *in vivo* spielen könnte. Unter Abschnitt 3.1.7 sind vier Möglichkeiten aufgeführt, wie eine Blockade von CTLA-4 wirken könnte, damit es zu einer verstärkten Immunantwort kommt. Zusammengefasst lauten diese:

1. Ein schnelleres Priming, d.h. die T-Zellen fangen früher an, sich zu teilen.
2. Der Zellen können sich schneller teilen.
3. Die T-Zellen überleben länger.
4. Es werden mehr T-Zellen rekrutiert.

Eine Theorie zum Einfluss des CTLA-4 auf das Priming von T-Zellen lautet, dass CTLA-4 die Aktivierungsschwelle beeinflusst. Die T-Zelle würde positive Signale wie z.B. durch den TCR oder CD28 mit negativen Signalen von CTLA-4 integrieren und sich dann entscheiden, die Zellteilung einzuleiten oder inaktiv zu bleiben (Gett and Hodgkin, 2000). Die Gruppe von Lanzavecchia konnte zeigen, dass die Zeit, die benötigt wird, um eine T-Zell zu aktivieren, mit der Stärke des TCR-Signals und der CD28-Kostimulation korreliert. Je stärker diese Signale sind, desto schneller lassen sich naive Zellen aktivieren (Iezzi et al., 1998). Möglicherweise würde auch eine Blockade des negativen Signals von CTLA-4 zu einer schnelleren Entscheidung führen. Falls eine solche Entscheidung vor jedem neuen Zellzyklus nach der anfänglichen Aktivierung getroffen muss, könnte eine Blockade von CTLA-4 durch Fab-Fragment auch zu einer beschleunigten Zellteilung führen. Die Frage, ob die T-Zellen schneller aktiviert werden oder sich nach der Aktivierung schneller teilen, sind durch die Versuche zur Kinetik der T-Zellaktivierung in Abschnitt 3.1.7 untersucht worden, bei denen die Zellteilung von CFSE-markierten T-Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen verfolgt wurde.

Die Abb. 3.1.7.1.2-4 zeigen eindeutig, dass sich die Kinetik der Proliferation durch die Blockade von CTLA-4 nicht veränderte, d.h. auch nicht beschleunigt wurde. Nach drei Tagen waren bei einer Stimulation von T-Zellen mit SkMel B7.2 weder mit Medium alleine noch bei der Zugabe von anti-CTLA-4 Fab-Fragment sich teilende Zellen sichtbar. Erst nach fünf Tagen zeigten sich in beiden Populationen gleichzeitig die ersten sich in der Proliferation befindlichen Zellen. Am Tag sieben hatten sich die T-Zellen, die aktiviert wurden, dann fast alle fünfmal geteilt. Ein Unterschied bestand darin, dass eine Blockade von CTLA-4 zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der Zellen führt, die sich gerade in der Proliferation befanden. Diese verstärkte Proliferation war sowohl bei CD4⁺-T-Zellen, als auch bei CD8⁺-T-Zellen zu beobachten. Es gab also keinen Unterschied im Proliferationsmuster bzw. der Kinetik zwischen T-Zellen, die mit Medium alleine oder mit dem anti-CTLA-4-Fab-Fragment inkubiert wurden (Abb. 3.1.7.2.4). Dieses Ergebnis ließ sich in mindestens sechs unabhängigen Experimenten, d.h. mit T-Zellen von unterschiedlichen Spendern bestätigen. Bei jedem dieser Experimente war das Proliferationsmuster der Zellen identisch, unabhängig davon, ob sich die Zellen wie in Abb. 3.1.7.2.5 sechsmal oder sogar bis zu neunmal geteilt hatten (Abb. 3.1.9.1 B). Besonders deutlich wird dies, wenn

man in einer Grafik die Zellen je Zellzyklus gegen die Anzahl der Zellzyklen aufträgt, wie es in Abb. 3.1.7.2.7 für die CD4⁺-T-Zellen eines Experimentes durchgeführt worden ist.

Diese Daten lassen den eindeutigen Schluss zu, dass eine Blockade von CTLA-4 weder zu einem beschleunigten Priming der T-Zellen führt noch den Eintritt oder den Verlauf der Zellteilung beschleunigt. Wäre CTLA-4 an einem dieser Schritte beteiligt, hätten sich die Proliferationsmuster verschieben müssen.

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war das Ergebnis, dass es möglich war, die Proliferation der T-Zellen zu steigern, obwohl das CTLA-4 nur für die ersten 24 h des Priming blockiert war (3.1.7.1.1). Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da CTLA-4 auf der Oberfläche von ruhenden T-Zellen nicht nachweisbar ist (Vandenborre et al., 1999). Zumindest mit immunhistologischen Methoden gelingt dieser Nachweis praktisch nicht. In der Arbeit von Wang et al. konnte mit sehr viel sensitiverer RT-PCR zumindest die Expression von CTLA-4 auf RNA-Ebene gezeigt werden (Wang et al., 2001). Allerdings zeigt sich hier, dass der Großteil der T-Zellen, die spontan CTLA-4 exprimieren, vermutlich den Phänotyp von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen hat. Ob auch klassische, naive T-Zellen tatsächlich CTLA-4 auf der Oberfläche exprimieren, ist noch nicht abschließend gezeigt worden. Doch auch die Ergebnisse anderer Arbeiten deuten auf einen Einfluss von CTLA-4 auch während der frühen Phase der Aktivierung von T-Lymphozyten hin. So konnte in den Arbeiten von Blair et al. eine Inhibition der IL-2-Produktion in peripheren humanen T-Lymphozyten bereits 4 Stunden nach der Ligation von anti-CTLA-4-Ak im Vergleich zu einer Stimulation nur mit anti-CD3 und anti-CD28 beobachtet werden (Blair et al., 1998).

Durch die Entnahme des Fab-Fragment-haltigen Überstandes (siehe 2.6.9) wurde der größte Teil des freien Fab-Fragments aus dem Medium entfernt. In der Kultur verblieben allerdings Fab-Fragmente, die schon auf der Oberfläche der T-Zellen gebunden hatten. Durch die geringe Halbwertszeit von CTLA-4 auf der Oberfläche (Iida et al., 2000; Egen and Allison, 2002) und damit auch von an dem Molekül haftende Antikörper bzw. Fab-Fragmente, sollten kurze Zeit nach der Entnahme des Fab-Fragment-haltigen Überstandes keine CTLA-4-Moleküle mehr durch Fab-Fragmente blockiert werden. Da ein eindeutiger Nachweis der Expression von CTLA-4 auf der Oberfläche von T-Zellen aufgrund der geringen Expression nicht möglich war (eigene Daten, nicht gezeigt), ließ sich dies allerdings nicht direkt zeigen.

Die Ergebnisse in Abschnitt 3.1.7.1 lassen den Schluss zu, dass CTLA-4 in dem hier verwendeten System keine bedeutende Rolle für das Überleben der T-Zellen nach einer Aktivierung spielt. Wäre dies nämlich der Fall, hätte die CTLA-4-Blockade vor allem wirksam sein müssen, nachdem die T-Zellen schon mehrere Zellzyklen durchlaufen hatten. Zumindest auf dem erstem Blick widersprechen diese Daten Experimenten, die die Arbeitsgruppe von Stephen Reiner durchgeführt hat (Doyle et al., 2001). Bei CD4⁺-T-Zellen aus CTLA-4^{+/+}-Mäusen (wt) wurde um so mehr CTLA-4 exprimiert, je mehr Zellzyklen die T-Zellen durchlaufen hatten. Die Proliferation der Zellen wurde nach mehreren Zellzyklen durch Apoptose der T-Zellen begrenzt. Anders verhielten sich dagegen die CD4⁺-T-Zellen aus CTLA-4^{-/-}-Mäusen: Diese schienen unbegrenzt zu proliferieren und ließen sich deshalb deutlich schlechter mit Propidiumiodid anfärben. Aus diesen Daten lässt sich dann schließen, dass CTLA-4 in Mäusen durchaus eine Rolle beim Auslösen oder Verhindern des

Aktivierungs-induzierten Zelltodes spielt. Die Differenz zu den Daten dieser Arbeit mag einen Unterschied in der Funktion von CTLA-4 zwischen Menschen und Mäusen reflektieren, kann aber auch dadurch erklärt werden, dass CTLA-4 sowohl bei der Initiation der Immunantwort als auch beim Abschalten durch den Aktivierungs-induzierten Zelltod eine Rolle spielt. Letzteres war in dieser Arbeit vielleicht deshalb noch nicht sichtbar, weil sich der Effekt einer CTLA-4-Blockade erst zu einem Zeitpunkt bemerkbar macht, an dem die Versuche in dieser Arbeit schon ausgewertet waren.

Wenn sich durch eine Blockade von CTLA-4 weder die Kinetik der Proliferation noch das Überleben der T-Zellen beeinflussen lässt und diese Blockade schon beim Priming der Zellen wirksam ist, lässt dies nur den Schluss zu, dass vermehrt Zellen in den Pool der aktivierten Zellen rekrutiert werden. Dieses passt zu der Hypothese, dass die Expression von CTLA-4 die Aktivierungsschwelle der T-Zellen beeinflusst. Eine T-Zelle, die einen TCR mit hoher Affinität für ihr Antigen exprimiert, bekommt über diesen ein so starkes Aktivierungssignal, dass ein schwaches inhibitorisches Signal durch gering exprimiertes CTLA-4 die Zellteilung nicht stoppen kann. Anders sieht dies bei T-Zellen mit niedrigaffinem TCR aus. Dort wird nur ein schwaches Aktivierungssignal in den Zellkern geleitet. Das schwache inhibitorische Signal des auch hier schwach exprimierten CTLA-4 reicht in diesem Fall aus, um die Aktivierungsschwelle so weit zu heben, dass die Zelle nicht in den Zellzyklus eintreten kann. Eine Blockade von CTLA-4, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt worden ist, führt nun dazu, dass die Aktivierungsschwelle gesenkt wird und nun auch das schwache Signal des niedrigaffinen TCR ausreicht, um eine Proliferation der T-Zellen auszulösen. Ist die Entscheidung, sich zu teilen einmal gefallen, erfolgen die nächsten Zellteilungen unabhängig von weiteren Signalen über den TCR oder CD28 (siehe 4.8.5). Wie unter 3.1.7.4 dargestellt, lässt sich anhand der nach sieben Tagen in der Proliferation befindlichen T-Zellen die Anzahl der Zellen abschätzen, die initial auf den allogenen Stimulus reagiert haben. Es zeigte sich dann, dass bis zu achtmal mehr CD4⁺-T-Zellen anfangen zu proliferieren, wenn CTLA-4 nicht in der Lage ist, ein negatives Signal zu geben.

Die Arbeiten von A. Kruisbeek haben gezeigt, dass *in vivo* eine Reihe von niedrigaffinen TCR gibt, die gegen Selbstantigene gerichtet sind und normalerweise ihr Antigen ignorieren, sich bei einer Aktivierung jedoch in Effektor- und Memory-T-Zellen differenzieren. (de Visser et al., 2000). Eine Reihe von Studien hat mittlerweile zeigen können, dass es möglich ist, diese T-Zellen so zu aktivieren, dass sie einen Tumor eliminieren können, ohne dass es dabei zur Autoimmunität kommt (Morgan et al., 1998; Overwijk et al., 1998; Cordaro et al., 2002). Wahrscheinlich wurde in dieser Arbeit ein solches Phänomen in dem *in vitro* Modell beobachtet.

4.8.5 Kinetik der Proliferation in Abhängigkeit von der Kostimulation

Bei der Betrachtung der FACS-Abbildungen mit CFSE-markierten T-Zellen fällt auf, dass die T-Zellen recht synchron proliferieren (siehe Abb. 3.1.7.2.4). Außerdem sieht es so aus, als würden T-Zellen, wenn sie einmal aktiviert sind, entweder fünf bis neun Zellteilungen durchlaufen oder gar nicht proliferieren. Besonders deutlich sichtbar wird dies in Abb. 3.1.9.1. Die T-Zellen erhalten durch den in dieser Arbeit verwendeten allogenen Stimulus

wahrscheinlich ein recht unterschiedlich starkes TCR-Signal. Jedoch beeinflusst die Stärke des Signals nicht die Zahl der Zellteilungen. Dieses Signal bestimmt zusammen mit dem kostimulatorischen Signal nur, ob sich eine Zelle überhaupt teilt. Wird die Aktivierungsschwelle einmal überschritten, durchläuft die T-Zelle mehrere Zellteilungen unabhängig von der Stärke des Signals. Ein schwacher Stimulus führt dazu, dass sich weniger Zellen teilen, bewirkt jedoch nicht, dass sich diese Zellen nur zwei oder dreimal teilen, während Zellen, die einen starken Stimulus erhalten, neun oder zehn Zellzyklen durchlaufen.

In den Versuchen in Abschnitt 3.2 wurde untersucht, ob humane T-Zellen sich nach dieser „Alles oder Nichts“-Hypothese verhalten. Für das Signal über den TCR (Signal 1) kann die Hypothese in diesem System nicht formal getestet werden, da z.B. das Antigen nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt vollständig entfernt werden kann. Aber da bei der allogenen Antwort eine polyklonale T-Zellantwort durch TCR mit verschiedenen Affinitäten ausgelöst wird, scheint die Anzahl der Zellteilungen unabhängig von der Stärke des Signals zu sein. Das kostimulatorische Signal 2 wurde auf zwei verschiedene Weisen moduliert: Die Kostimulation wurde entweder durch ein „Ausdünnen“ mit SkMel wt reduziert oder die Intensität wurde durch eine Blockade mittels CTLA-4-Ig verringert.

Als erstes wurde getestet, wie das Proliferationsmuster aussieht, wenn man die Quantität der Kostimulation ändert (siehe Abb. 3.2.1.1) Dabei wurde die optimale Kostimulation durch 100% SkMel B7.2 durch die Zugabe von SkMel wt auf 5% vermindert. Es zeigte sich, dass zwar deutlich weniger T-Zellen aktiviert werden, diese aber das gleiche Proliferationsmuster wie bei einer Stimulation durch 100% SkMel B7.2 haben. Möglicherweise ist dies nicht überraschend, da einige T-Zellen gar keine Kostimulation erhalten, die wenigen mit direktem Kontakt zu einer SkMel B7.2 auf zellulärer Ebene aber weiterhin 100%. Eine Blockade der Kostimulation durch CTLA-4-Ig sollte nun die Intensität der Kostimulation auf allen SkMel B7.2 gleichermaßen senken. Die Grafik 3.2.2.1 veranschaulicht noch einmal den Unterschied zwischen den beiden Methoden. Dieser in Abb. 3.2.2.2 dargestellte Versuch zeigt, dass die Art der Blockade keinen Unterschied macht. Auch die Blockade mit CTLA-4-Ig (Abb. 3.2.2.2 C2) senkt nur die Anzahl der aktivierte Zellen, ändert aber das Proliferationsmuster im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 3.2.2.2 C1) nicht. Überschreitet eine T-Zelle ihre Aktivierungsschwelle, durchläuft sie eine Reihe von Zellzyklen, ohne dass eine vorangegangene Modulation der Kostimulation eine Wirkung hätte.

Eine vollständige Blockade der Kostimulation durch Zugabe hoher Konzentrationen an CTLA-4-Ig zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation konnte klären, wann die Entscheidung der T-Zellen zur Proliferation gefallen war, sodass sie dann unabhängig von der Kostimulation weiterlief (siehe Abb. 3.2.3.1). Schon 24 Stunden nach Beginn der Kostimulation konnte eine Blockade die Anzahl der Zellen, die sich nach sieben Tagen in der Proliferation befinden, nicht mehr verringern. War bis dahin die Entscheidung zur Proliferation gefallen, konnte sie durch eine Blockade von B7.2 nicht mehr revidiert werden. Auch blieb das Proliferationsmuster gleich, was zeigt, dass auch die weiteren Zellteilungen nicht durch diese Blockade beeinflusst wurden.

Damit konnte zum erstenmal gezeigt werden, dass sowohl humane CD4⁺-T-Zellen als auch CD8⁺-T-Zellen offensichtlich ein zellautonomes Programm besitzen, das nach dem Über-

schreiten der Aktivierungsschwelle weitgehend unabhängig von weiterer Kostimulation und wahrscheinlich auch von Signalen über den TCR das Fortschreiten durch mehrere Zellteilungen steuert. Physiologisch macht dieses insofern Sinn, als T-Zellen im lymphoiden Gewebe aktiviert werden, ihre Wirkung aber u.U. in der Peripherie entfalten. Einmal aktiviert, würden sie sich auf den Weg in die Peripherie begeben und auf dem Weg und vor Ort teilen, ohne dass sie weiter das kostimulatorische Signal einer APC bräuchten.

Als erstes wurde solche von antigenspezifischen Signalen unabhängige Proliferation bei murinen CD8⁺-T-Zellen gezeigt (van Stipdonk et al., 2001). Hier reichte eine Stimulation von 2 Stunden aus, um die Proliferation zu starten. Die Daten für murine CD4⁺-T-Zellen dagegen sind widersprüchlich. Es gibt eine Arbeit, die zeigt, dass auch murine CD4⁺-T-Zellen ein solches „Alles oder Nichts“-Programm besitzen (Lee et al., 2002). In der Arbeit von Foulds et al. wird allerdings u.a. in einen *in vivo* Modell gezeigt, dass CD4⁺-T-Zellen nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen durchlaufen und ein gänzlich anderes Proliferationsmuster zeigen als CD8⁺-T-Zellen (Foulds et al., 2002).

4.8.6 Verstärkte Effektorfunktion durch eine erhöhte IFN- γ Expression

Wichtig für einen therapeutischen Einsatz ist aber nicht nur die Tatsache, dass vermehrt antigenspezifische T-Zellen proliferieren, sondern auch die Frage, ob diese zusätzlich aktivierten Zellen auch Effektormechanismen besitzen. Die anti-Tumorwirkung von blockierendem Ak gegen CTLA-4, wie sie in Mäusen als erstes von Leach et al. beschrieben wurde und später von anderen Arbeiten bestätigt wurde (Leach et al., 1996; Yang et al., 1997; Shrikant et al., 1999; Sotomayor et al., 1999), beruht wahrscheinlich auf einer erhöhten Produktion von Interferon- γ (Paradis et al., 2001). In den Lymphknoten aus Mäusen, die mit anti-CTLA-4-Ak behandelt wurden, konnten erhöhte Mengen von IFN- γ nachgewiesen werden. Dieser anti-Tumoreffekt der CTLA-4-Blockade ließ sich durch blockierende Ak gegen IFN- γ komplett aufheben. Da die Erhöhung der IFN- γ -Expression wahrscheinlich die wichtigste Effektorfunktion von aktivierten T-Zellen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die T-Zellen nach Blockade von CTLA-4 vermehrt IFN- γ produzieren. Durch die in Abb. 3.1.9.1 dargestellten Versuche konnte gezeigt werden, dass die zusätzlich aktivierten T-Zellen auch deutlich mehr IFN- γ produzieren, als die T-Zellen in der Kontrollgruppe. Diese Steigerung der IFN- γ -Expression ist sowohl bei CD4⁺- als auch bei CD8⁺-T-Zellen zu beobachten. Dass eine gesteigerte INF- γ Produktion von CD4⁺-T-Zellen sogar in Abwesenheit von CD8⁺-T-Zellen dazu beitragen kann, Tumorzellen zu eliminieren, hat u.a. die Arbeit von Mumberg et al. gezeigt (Mumberg et al., 1999).

Es ist erwähnenswert, dass humane T-Zellen offensichtlich nur dann IFN- γ produzieren, wenn sie sich auch geteilt haben (3.1.8.1B). Ohne eine Teilung der T-Zellen kommt es zu keiner Aktivierung und Umwandlung in eine Effektorzelle. Bei Milzzellen aus Mäusen, die transgen für ein OVA-spezifischen TCR sind, produzieren nach einer Peptidstimulation auch die T-Zellen, die sich (noch) nicht geteilt haben INF- γ (persönliche Mitteilung Dr. S. Moré).

Ob die Erhöhung der IFN- γ -Expression nach der Blockade von CTLA-4 auch den Schluss zulässt, dass diese Blockade die T-Zellen eher in Richtung einer T_H1-Antwort treibt, lässt sich nicht mit Sicherheit folgern. Zwar wurde im intrazellulären FACS das T_H2-Zytokin IL-4 nicht detektiert, doch war möglicherweise die Methode einfach nicht sensitiv genug. Evtuell hätte eine Analyse durch einen ELISPOT zeigen können, ob IL-4 sezerniert wird oder nicht. Eine Analyse der Zytokinproduktion auf Einzelzellebene nach der Gabe von anti-CTLA-4-Ak in einem Maus-EAE-Modell hat ergeben, dass die Frequenz von IFN- γ - und IL-4-produzierenden CD4⁺-T-Zellen angestiegen ist. Es gibt bei Mäusen allerdings widersprüchliche Daten, ob eine Blockade von CTLA-4 nun eine T_H2-Antwort induziert, wie *in vitro* gezeigt wurde (Kato and Nariuchi, 2000), oder doch eine T_H1-Antwort unterstützt, wie u.a. eine verbesserte Abwehr einer *Leishmania major*-Infektion in normalerweise suszeptiblen BALB/c-Mäusen zeigt (Saha et al., 1998). Zumindest kann ein Engagement von CTLA-4 sowohl die Zytokinproduktion von T_H1- als auch T_H2-Klonen beeinflussen (Alegre et al., 1998). Der Einfluss von CTLA-4 auf die Differenzierung in T_H1 oder T_H2 hängt wahrscheinlich von dem Kontext der induzierten Immunantwort ab.

4.8.7 Gibt es einen direkten Einfluss von CTLA-4 auf CD8-T-Zellen?

Im Zusammenhang mit der Frage, welcher Mechanismus bei einer CTLA-4-Blockade wirkt, wurde auch untersucht, wie sich getrennte CD4⁺ und CD8⁺-Populationen verhalten. Eine Expression von CTLA-4 auf aktivierten CD8⁺-T-Zellen konnte sowohl auf murinen als auch humanen Zellen gezeigt werden (Linsley et al., 1992; Vandenborre et al., 1999), doch ob eine Blockade auch direkt zu einer vermehrten Rekrutierung von CD8⁺-T-Zellen führt war nicht bekannt. Zwar zeigte sich bei den Versuchen mit nicht-separierten T-Zellen, dass beide Subpopulationen nach einer CTLA-4-Blockade verstärkt proliferieren (siehe Abb. 3.1.7.2.4 und 3.1.7.2.5), doch stellte sich die Frage, ob die CD8⁺-T-Zellen evtl. auf die Hilfe von CD4⁺-T-Zellen angewiesen waren. Um diese Frage zu klären, wurden durch das „DynaL Positive Isolation Kit“ die CD4⁺ bzw. CD8⁺-T-Zellen mit hoher Reinheit isoliert und in dem allogenen Testsystem eingesetzt. Der Versuch in Abb. 3.1.7.8.2 (obere Reihe) zeigt, dass bei den Kontrollen jedesmal der gleiche Prozentsatz an CD4⁺-T-Zellen proliferiert, unabhängig davon, ob die CD4⁺-T-Zellen von den CD8⁺-T-Zellen getrennt wurden oder nicht. Bei den CD8⁺-Zellen teilten sich nur noch ca. ein Drittel der Zellen in Abwesenheit von CD4⁺-Zellen (Abb. 3.1.7.8.2 (untere Reihe)). Um zu zeigen, dass dieser Effekt nicht durch eine Schädigung der Zellen bei der Isolation verursacht wurde, wurden die isolierten CD8⁺-T-Zellen wieder mit CD4⁺-T-Zellen gemischt und dann mit SkMel B7.2 stimuliert. Es zeigte sich, dass dann sogar ein höherer Prozentsatz an Zellen proliferierten als bei den unseparierten T-Zellen, die Zellen also nicht geschädigt waren (Abb. 3.1.7.8.2 (untere Reihe, rechts)). Außerdem wurde der Anteil der sich teilenden isolierten CD8⁺-T-Zellen im Gegensatz zu dem der CD4⁺-T-Zellen nicht erhöht, wenn das CTLA-4 durch die Fab-Fragmente blockiert wurde.

Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass in dem hier verwendeten System die Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen sehr stark von der Hilfe der CD4⁺-T-Zellen abhängig ist und möglicherweise die Verstärkung der Proliferation nach einer CTLA-4-Blockade auf eine verbesserte Hilfe durch die CD4⁺-T-Zellen zurückzuführen ist und nicht auf einen direkten Ein-

fluss des CTLA-4 auf die CD8⁺-T-Zellen. Welche Rolle CTLA-4 auf CD8⁺-T-Zellen *in vivo* beim Menschen spielt, bedarf noch weiterer Untersuchungen, da es auch *in vivo* auf CD8⁺-T-Zellen beobachtet wird (Castan et al., 1997; Steiner et al., 1999).

4.8.8 Werden regulatorische T-Zellen blockiert?

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Blockade von CTLA-4 regulatorische T-Zellen beeinflusst. T_{reg} sind sowohl in der Maus, als auch beim Menschen beschrieben worden. Diese erst neuentdeckte Population von CD4⁺CD25⁺-Zellen kann die Proliferation von CD25⁻-T-Zellen unabhängig von der Spezifität des TCR inhibieren (Thornton and Shevach, 1998) und exprimiert deutlich mehr CTLA-4 auf der Oberfläche als naive CD4⁺-T-Zellen (Jonuleit et al., 2001; Wang et al., 2001). Ihre Funktion liegt vermutlich in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Shevach et al., 2001). Zumindest würde eine Blockade der inhibitorischen Funktion dieser Zellen auch verstärkt T-Zellen zur Proliferation anregen können. Der Einfluss von CTLA-4 auf die Funktion der T_{reg} ist allerdings kontrovers. Die meisten Arbeiten mit humanen Modellen konnten einen solchen Einfluss nicht zeigen (Thornton and Shevach, 1998; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001). In zwei Arbeiten mit murinen Autoimmunmodellen wurde allerdings gezeigt, dass eine Blockade von CTLA-4 durch Antikörper die inhibitorische Funktion der T_{reg} aufhebt und es zu einer Verstärkung von Autoimmunkrankheiten kommt (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000).

Durch eine Blockade von CTLA-4 ist es *in vitro* nicht gelungen die inhibitorische Funktion von humanen T_{reg} aufzuheben (Baecher-Allan et al., 2001). Möglicherweise unterscheiden sich humane und murine regulatorische T-Zellen auch in dieser Funktion. Für die Ergebnisse dieser Arbeit bedeuten diese Befunde jedenfalls, dass die beobachtete Steigerung der Proliferation nach einer CTLA-4-Blockade vermutlich nicht auf eine Inhibierung der regulatorischen T-Zellen zurückzuführen ist. Letztlich Beweisen ließe sich dies allerdings nur, indem man vor den Experimenten die CD4⁺-T-Zellen in CD25⁻ und CD25⁺-Population trennt und eine Steigerung der Proliferation durch die anti-CTLA-4-Fab-Fragment auch dann noch erreicht wird, wenn keine T_{reg} mehr vorhanden sind, d.h. in der CD25⁻ Population.

4.9 Warum wurde keine Anergie erzeugt?

Überraschend war, dass mit SkMel wt stimulierte T-Zellen nicht anerg wurden, obwohl sie nur das Signal 1 über den TCR und kein kostimulatorisches Signal erhalten hatten. Denn bei einer Restimulation dieser Zellen mit syngenem SkMel B7.2 war die Proliferation genauso stark wie eine Primärstimulation mit SkMel B7.2 (siehe Abb. 3.1.10.1). Über die Ursache lässt sich allerdings nur spekulieren. Möglicherweise exprimieren die SkMel-Zellen weitere Moleküle, die zwar kein echtes kostimulatorisches Signal geben können, aber eine Art „Überlebenssignal“ übermitteln und verhindern so eine Anergie der T-Zellen. Ein Kandidat dafür könnte LFA3 (CD58) sein, das auch von den SkMel exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Es wurde beschrieben, dass Anergie bei einer allogenen Immunant-

wort nur dann ausgelöst werden konnte, wenn man LFA3 mit Antikörpern blockiert (Savage and Brooks, 1995). Andere Arbeiten haben gezeigt, dass in einer allogenen Antwort nur dann echte Anergie ausgelöst wird, wenn der TCR sein spezifisches Peptid im Kontext mit dem richtigen MHC ohne Kostimulus erkennt (Pawelec et al., 1994). Da dies bei der Alloreaktion in dieser Arbeit kaum der Fall sein dürfte, bietet auch dies einen Erklärungsansatz.

Was auch immer die Ursachen für die Abwesenheit von Anergie sein mögen, es ließ sich in diesem Modell nicht testen, ob eine Blockade von CTLA-4 in der Lage wäre eine T-Zell- Anergie zu durchbrechen.

4.10 Bedeutung der Ergebnisse für eine CTLA-4 Blockade in der Therapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten letztlich auch Hinweise darauf geben, ob eine Blockade von CTLA-4 bei Patienten mit Krebserkrankungen das Immunsystem unterstützen kann. Neben der Frage, wie und ob eine solche Therapie überhaupt sinnvoll wäre, ist es wichtig zu überlegen, in welcher Form eine solche Therapie durchgeführt werden könnte. Ein kritischer Punkt ist, mit welchen Mitteln CTLA-4 blockiert werden soll. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass der Gesamtantikörper BNI3 keine Wirkung besitzt (siehe auch 4.8.2). Im Gegensatz dazu scheint der Einsatz des entsprechenden Fab-Fragments, vielversprechender. Doch bei allen Proteinen, die wie der Antikörper BNI3 aus der Maus stammen und nicht humanen Ursprungs sind, reagiert das Immunsystem auf diese fremden Proteine. Es besteht also die Gefahr, dass eine Therapie mit Fab-Fragment schnell an Wirksamkeit verliert, da diese durch induzierte anti-Maus-Ig-Antikörper neutralisiert würden. Eine Strategie dieses Problem zu umgehen bzw. die Akzeptanzdauer zu verlängern, ist der Versuch, einen Antikörper zu „humanisieren“. Eine elegante Methode dafür wäre die Herstellung der Antikörper in einer transgenen Maus, deren Genom so verändert ist, dass ihre Antikörper einen humanen Fc-Teil tragen (Winter and Harris, 1993).

Sollte sich die These bestätigen, dass eine Blockade des CTLA-4 vermehrt T-Zellen während der Initiierung einer Immunantwort rekrutiert (siehe auch 4.8.4), dann wären möglicherweise nur eine kurzzeitige Gabe des Fab-Fragments nötig. Einmal aktiviert, entwickeln die T-Zellen dann ihre normalen Effektormechanismen auch unabhängig von einer Blockade von CTLA-4. Das Problem einer Neutralisierung des Fab-Fragment durch das Immunsystem würde dann nicht bestehen.

Besteht die Gefahr von Autoimmunität?

Vor einer möglichen Anwendung beim Menschen hat natürlich die Frage nach der Sicherheit einer solchen Therapie oberste Priorität, vor allem wenn man den letalen Phänotyp der CTLA-4^{-/-} Mäuse bedenkt. Dazu kommt, dass CTLA-4 offensichtlich eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz spielt und bei Mäusen eine Blockade von CTLA-4 den Ausbruch von Autoimmunkrankheiten beschleunigen oder verstärken kann (Karandikar et al., 1998; Luhder et al., 1998; Ratts et al., 1999). Auch in dieser Arbeit führte eine Blockade von CTLA-4 zum Teil zu einer erhöhten Proliferation von T-Zellen, ohne dass es einen exogenen Stimulus gab (siehe Abb. 3.1.6.1.1). Es ist nicht klar wodurch

diese verstärkte Proliferation ausgelöst wird, doch ist es denkbar, dass dies potentiell selbstreaktive Zellen sind, die nach Blockade des inhibitorischen Signals von CTLA-4 wieder mit der Proliferation beginnen. Zwar war die Proliferation im Vergleich zu einer durch die SkMel B7.2 stimulierten Proliferation sehr schwach, doch es reichen möglicherweise sehr wenige aktive autoreaktive T-Zellen, um eine Autoimmunkrankheit auszulösen. Eine Durchsicht der Literatur zeigt jedoch, dass es im murinen System nicht gelungen ist, durch die Gabe eines Antikörpers gegen CTLA-4 die gleichen Symptome der letalen Lymphoproliferation auszulösen, wie sie in den CTLA-4^{-/-}-Mäusen auftreten. Die Autoimmunität ließ sich nur dann erzeugen, wenn mit einem Selbst-Antigen immunisiert wurde. Im Allgemeinen hat eine Blockade von CTLA-4 bisher keinerlei negative Nebeneffekte gezeigt. Die Firma GenPharm/Medarex hat einen humanen anti-CTLA-4 Antikörper (MDZ-010) in entsprechenden gentechnisch veränderten Mäusen hergestellt und in ersten Phase I Studien getestet. Es waren keine Anzeichen von Autoimmunität zu erkennen und ein Teil der Patienten mit Prostata-Krebs zeigten eine signifikante Reduzierung des prostate-specific antigen (PSA), was einen Rückgang der Tumormasse anzeigt (American Society of Clinical Oncology, Annual Meeting 2002). Diese ersten Versuche stimmen optimistisch in Bezug auf die Anwendung einer CTLA-4-Blockade bei Tumorerkrankungen.

CTLA-4 in Kombination mit anderen Therapien

Eine Blockade von CTLA-4 sollte sicher nicht die einzige Strategie bei der Bekämpfung eines Tumors sein. Erfolgversprechend scheint die Kombinationen mit anderen neuen Therapieansätzen zu sein. Damit das Immunsystem Krebszellen bekämpfen kann, müssen die T-Zellen diese überhaupt als „fremd“ erkennen. Zwar sind mittlerweile eine Reihe von Tumorantigenen bekannt (Jäger et al., 2002), doch bei einigen eigentlich potentiell immunogenen Tumoren entwickelte sich keine protektive Immunantwort, da diese keine kostimulatorischen Moleküle exprimierten. Daher ist eine Strategie, Zellen eines immunogenen Tumors *ex vivo* mit B7 zu transfizieren und die (bestrahlten) Zellen dann zurück in den Patienten zugeben, wo diese Krebszellen jetzt von den Zellen des Immunsystems erkannt werden. Dass diese Strategie prinzipiell erfolgreich ist, konnte wiederholt im murinen System gezeigt werden (Übersicht bei (Allison et al., 1995)). Der Einsatz von blockierenden Fab-Fragment gegen CTLA-4 könnte dann die meist noch schwache Antwort gegen die Tumorzellen durch ein Senken der Aktivierungsschwelle der T-Zellen verstärken. Im murinen System hat sich die Vakzinierung mit GM-CSF-transfizierten Tumorzellen zusammen mit einer CTLA-4-Blockade als besonders erfolgreich bei der Abwehr von B16-Melanomen erwiesen (van Elsas et al., 1999). Vermutlich wird hierbei durch das GM-CSF das „cross-priming“ durch die DC verstärkt (Dranoff et al., 1993). Mit der Kombination von anti-CTLA-4 und GM-CSF exprimierenden Tumorzellen sind erfolgreich auch Brust- und Prostata-Krebs bekämpft worden (Hurwitz et al., 1998; Hurwitz et al., 2000). Möglicherweise können die dendritischen Zellen auch direkt zur Vakzinierung eingesetzt werden, nachdem diese *ex vivo* mit den Tumorzellen fusioniert (Gong et al., 1997) oder mit Tumor-assoziierten Antigenen transfiziert werden. Durch diese Methode stellt man sicher, dass die Tumorantigene nicht erst von den DC aufgenommen werden müssen und somit besser präsentiert wurden. Eine Übersichtsarbeit von T. Fukao zeigt, was auf diesem Gebiet bisher erreicht worden ist (Fukao, 2002). Erste klinische Versuche wurden mit solchen

fusionierten DC schon durchgeführt (Kikuchi et al., 2001). Allerdings gibt es aus murinen Modellen noch keine Daten, ob eine solche Therapie durch die Blockade von CTLA-4 unterstützt werden kann.

Besonders erfolgversprechend erscheint eine Vakzinierung mit B7-transfizierten Tumorzellen in Kombination mit einer anti-CTLA-4-Therapie, wenn der Haupttumor durch einen chirurgischen Eingriff entfernt worden ist, aber möglicherweise noch Mikrometastasen vorhanden sind (minimal residual disease). Von Kwon et al. konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass eine Blockade von CTLA-4 die Bildung von Metastasen nach der Entfernung des Primärtumors tatsächlich verhindert (Kwon et al., 1999). Aus immunologischer Sicht ist der Zeitpunkt direkt nach dem Entfernen des Primärtumors am sinnvollsten, um mit einer Immuntherapie zu beginnen. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass es sinnvoll ist zeitgleich mit der Vakzinierung durch B7-transfizierte Tumorzellen auch mit der anti-CTLA-4-Therapie zu beginnen, da auf diese Weise die maximale Anzahl an T-Zellen rekrutiert wird.

Wichtig bei der Verwendung von B7-transfizierten Tumorzellen ist, dass diese Therapie frühzeitig beginnt. Denn im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es sehr früh während der Bildung eines Tumors zu einer Anergie der T-Zellen kommt, die ein Antigen auf der Oberfläche des Tumors erkennen. Diese Anergie, ausgelöst durch fehlende Kostimulation seitens des Tumors, kann nicht durch später hinzugegebene, mit B7-transfizierte Tumorzellen aufgehoben werden (Staveley-O'Carroll et al., 1998). Dieses könnte ein signifikantes Hindernis bei der Entwicklung einer Immuntherapie mit oder ohne Blockade von CTLA-4 darstellen, bei der versucht wird, die Anergie gegen einen Tumor zu durchbrechen.

4.11 Ausblick

Diese Arbeit hat im Prinzip gezeigt, dass *in vitro* eine Blockade von CTLA-4 mit dem Fab-Fragment des Antikörper BNI3 zu einer verstärkten Immunantwort führt. In einem nächsten Schritt könnte der experimentelle Einsatz in der Klinik Aufschluss darüber geben, ob es lokal an der Stelle der Administration bzw. dem zu bekämpfenden Tumor zu einer verstärkten Infiltration von aktivierten Lymphozyten kommt.

Neben einer klinischen Studie wäre es wichtig, den Effekt der CTLA-4-Blockade weiter zu charakterisieren: Dazu zählt die genauere Untersuchung des Zytokinprofils der aktivierten T-Zellen und Experimente zu der Frage, ob neben einer erhöhten IFN- γ -Expression weitere Effektormechanismen wie z.B. die spezifische Zytotoxizität verstärkt sind.

5. Zusammenfassung

Für die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen und für ihre Differenzierung in Effektorzellen sind neben dem antigenspezifischen Signal über den TCR weitere kostimulatorische Signale erforderlich. Das nachhaltigste kostimulatorische Signal wird über CD28 vermittelt, welches konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird. Die Bindung von CD28 an seine Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche ausschließlich von APC exprimiert werden, verringert die Aktivierungsschwelle der T-Zellen, erhöht die Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl- x_L und stimuliert die Produktion von IL-2. Das ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende CD28-Homolog CTLA-4 (CD152) wird hauptsächlich auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen exprimiert und bindet mit B7.1 und B7.2 die gleichen Liganden wie CD28, jedoch mit ca. 20fach höhere Affinität. Engagement von CTLA-4 inhibiert jedoch die Proliferation der T-Zellen, indem die Expression des IL-2-Rezeptors reduziert, die IL-2 Produktion vermindert und der Zellzyklus arretiert werden. Auf diese Weise setzt CTLA-4 vermutlich die Aktivierungsschwelle herauf und verhindert so eine Aktivierung von T-Zellen mit einem niedrig affinen TCR und begrenzt evtl. darüber hinaus die klonale Expansion aktivierter T-Zellen.

Im murinen System konnte eine Blockade von CTLA-4 durch monoklonale Antikörper gegen CTLA-4 *in vitro* und *in vivo* die Immunantwort bei einer Reihe experimenteller Tumorsysteme verstärken, darunter colorektales Karzinom, Nierenkarzinom, Lymphom und Fibroblasten Zell-Linien. Diese Verstärkung der Immunantwort war abhängig von CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ähnliche Mechanismen auch bei T-Zellen des humanen Immunsystems wirken und ob sich deren anti-Tumor-Antwort durch die Blockade von CTLA-4 verstärken lässt.

Für diesen Zweck wurden monoklonale Antikörpern gegen humanes CTLA-4 verwendet, von denen einige die Bindung von CTLA-4 an die Liganden B7.1 und B7.2 blockieren. Um zu testen, welche immunmodulatorischen Eigenschaften diese Antikörper haben, wurde ein *in vitro* Testsystem etabliert, welches eine T-Zellantwort gegen Tumorzellen simuliert. Die humane Melanomzell-Linie SkMel63 und Derivate dieser Zell-Linie, die mit B7.2 transfiziert waren, wurden eingesetzt, um eine allogene Immunantwort auszulösen. Dabei sollten die Alloantigene Tumorantigene simulieren. Während aufgereinigte humane T-Zellen auf die Stimulation mit SkMel-Zellen vom Wildtyp aufgrund der fehlenden Kostimulation nicht reagierten, wurden sie durch die B7.2-Transfektanten massiv zur Proliferation angeregt.

Im Gegensatz zu Experimenten bei Mäusen war Gesamtantikörper gegen humanes CTLA-4 unwirksam. Fab-Fragment des gleichen Antikörpers war jedoch in der Lage, die Immunantwort gegen die B7-exprimierenden SkMel-Zellen zu verstärken. Der Unterschied liegt möglicherweise darin, dass bivalente Gesamtantikörper gegen CTLA-4 durch Kreuzvernetzen ein inhibitorisches Signal auslösen können, während monovalente Fab-Fragmente ein solches Signal über CTLA-4 wirklich blockieren.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des CTLA-4 für 24 Stunden ausreichte, um die Proliferation der T-Zellen zu verstärken. Durch den Einsatz von CFSE-markierten T-Zellen wurde die Kinetik und das Proliferationsmuster dieser T-Zellen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von CTLA-4 die Kinetik der Alloantwort nicht änderte, weder bei CD4⁺ noch CD8⁺-T-Zellen. Auch die Anzahl der Zellteilungen wurde nicht beeinflusst. Die verstärkte Antwort resultierte viel mehr aus einer vermehrten Rekrutierung von T-Zellen in den Pool der aktivierten Zellen. Vermutlich verringert eine Blockade von CTLA-4 durch die Fab-Fragmente die Aktivierungsschwelle, sodass jetzt auch Zellen mit einem niedrigaffinen TCR aktiviert wurden. Eine weitere Charakterisierung der proliferierenden Zellen konnte zeigen, dass die zusätzlich aktivierten Zellen auch Effektorfunktion entwickelten, da sie verstärkt IFN- γ exprimieren. Möglicherweise ist dies ein Indiz dafür, dass eine Blockade von CTLA-4 die Immunantwort in Richtung einer T_H1-Antwort lenkt.

Die Rekrutierung einer größeren Zahl von Zellen in den Pool aktivierter T-Zellen unter CTLA-4-Blockade lässt sich am besten durch folgendes Funktionsmodell für CTLA-4 erklären: Die erhöhte Expression von CTLA-4 auf teilweise aktivierten T-Zellen verhindert deren vollständige Aktivierung, wenn diese über einen niedrigaffinen TCR nur ein schwaches Signal erhalten. Wird CTLA-4 blockiert, teilen sich auch diese T-Zellen und differenzieren sich zu Effektorzellen mit derselben Effizienz wie T-Zellen mit einem hochaffinen TCR. Bei einer Krebserkrankung mit einer schwachen gegen den Tumor gerichteten Immunantwort könnte eine solche Blockade von CTLA-4 nun dazu beitragen, zusätzliche T-Zellen zu rekrutieren. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um zu zeigen, ob dieses tatsächlich die Balance zwischen Tumorabwehr und Tumortoleranz zu Gunsten einer erfolgreichen Tumorabstoßung verschieben kann.

Durch die Zugabe von SkMel wt zu SkMel B7.2 einerseits oder von CTLA-4-Ig andererseits lässt sich das kostimulatorische Signal auf zwei verschiedene Weisen modulieren: durch Verminderung der Dichte von Tumorzellen, die jeweils ein maximales kostimulatorisches Signal vermitteln oder durch Verminderung der Dichte kostimulatorischer Moleküle gleichmäßig auf allen Tumorzellen. Weder durch die eine, noch durch die andere Maßnahme änderte sich das Proliferationsmuster bzw. die Kinetik der CFSE-markierten T-Zellen im Vergleich zu einer Positivkontrolle mit 100% SkMel B7.2-Kostimulation. Lediglich die Zahl proliferierender T-Zellen nahm ab. Offensichtlich besitzen humane T-Zellen ein zellautonomes Programm, welches bewirkt, dass einmal aktivierte T-Zellen die nächsten Zellteilungen ohne zusätzliche Kostimulation durchlaufen. Alle Ergebnisse dieser Arbeit stützen damit die „Alles oder Nichts“-Hypothese für die Aktivierung von T-Zellen, sowohl für das erste Signal als auch für die kostimulatorischen Signale über CD28 oder CTLA-4.

Literaturverzeichnis

Abramson, S., R. G. Miller and R. A. Phillips (1977). "The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems." *J Exp Med* **145** (6): 1567-79.

Alegre, M. L., H. Shiels, C. B. Thompson and T. F. Gajewski (1998). "Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells." *J Immunol* **161** (7): 3347-56.

Allison, J. P., A. A. Hurwitz and D. R. Leach (1995). "Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses." *Curr Opin Immunol* **7** (5): 682-6.

Antonia, S. J. (1999). "B7-1 gene-modified tumor cell vaccines." *Curr Opin Mol Ther* **1** (1): 50-6.

Bachmann, M. F., A. Gallimore, E. Jones, B. Ecabert, H. Acha-Orbea and M. Kopf (2001). "Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered." *Eur J Immunol* **31** (2): 450-8.

Bachmann, M. F., P. Waterhouse, D. E. Speiser, K. McKall-Faienza, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1998). "Normal responsiveness of CTLA-4-deficient anti-viral cytotoxic T cells." *J Immunol* **160** (1): 95-100.

Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman and D. A. Hafler (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." *J Immunol* **167** (3): 1245-53.

Balzano, C., N. Buonavista, E. Rouvier and P. Golstein (1992). "CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes." *Int J Cancer Suppl* **7**: 28-32.

Baroja, M. L., D. Luxenberg, T. Chau, V. Ling, C. A. Strathdee, B. M. Carreno and J. Madrenas (2000). "The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation." *J Immunol* **164** (1): 49-55.

Beier, K. C., A. Hutloff, A. M. Dittrich, C. Heuck, A. Rauch, K. Buchner, B. Ludewig, et al. (2000). "Induction, binding specificity and function of human ICOS." *Eur J Immunol* **30** (12): 3707-17.

Bjorkman, P. J. (1997). "MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions." *Cell* **89** (2): 167-70.

Blair, P. J., J. L. Riley, B. L. Levine, K. P. Lee, N. Craighead, T. Francomano, S. J. Perfetto, et al. (1998). "CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction." *J Immunol* **160** (1): 12-5.

Boise, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, T. Lindsten and C. B. Thompson (1995). "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." *Immunity* **3** (1): 87-98.

Brodie, D., A. V. Collins, A. Iaboni, J. A. Fennelly, L. M. Sparks, X. N. Xu, P. A. van der Merwe, et al. (2000). "LICOS, a primordial costimulatory ligand?" *Curr Biol* **10** (6): 333-6.

Brunet, J. F., F. Denizot, M. F. Luciani, M. Roux-Dosseto, M. Suzan, M. G. Mattei and P. Golstein (1987). "A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4." *Nature* **328** (6127): 267-70.

Brunner, M. C., C. A. Chambers, F. K. Chan, J. Hanke, A. Winoto and J. P. Allison (1999). "CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation." *J Immunol* **162** (10): 5813-20.

- Burr, J. S., N. D. Savage, G. E. Messah, S. L. Kimzey, A. S. Shaw, R. H. Arch and J. M. Green (2001). "Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL." *J Immunol* **166** (9): 5331-5.
- Calvo, C. R., D. Amsen and A. M. Kruisbeek (1997). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor zeta and ZAP70." *J Exp Med* **186** (10): 1645-53.
- Carreno, B. M., F. Bennett, T. A. Chau, V. Ling, D. Luxenberg, J. Jussif, M. L. Baroja, et al. (2000). "CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression." *J Immunol* **165** (3): 1352-6.
- Castan, J., K. Tenner-Racz, P. Racz, B. Fleischer and B. M. Broker (1997). "Accumulation of CTLA-4 expressing T lymphocytes in the germinal centres of human lymphoid tissues." *Immunology* **90** (2): 265-71.
- Chambers, C. A. and J. P. Allison (1997). "Co-stimulation in T cell responses." *Curr Opin Immunol* **9** (3): 396-404.
- Chambers, C. A., M. S. Kuhns and J. P. Allison (1999). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4(+) T cell responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (15): 8603-8.
- Chambers, C. A., T. J. Sullivan and J. P. Allison (1997). "Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells." *Immunity* **7** (6): 885-95.
- Chambers, C. A., T. J. Sullivan, T. Truong and J. P. Allison (1998). "Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8+ T cells." *Eur J Immunol* **28** (10): 3137-43.
- Chang, T. T., V. K. Kuchroo and A. H. Sharpe (2002). "Role of the B7-CD28/CTLA-4 pathway in autoimmune disease." *Curr Dir Autoimmun* **5**: 113-30.
- Chapoval, A. I., J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, et al. (2001). "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production." *Nat Immunol* **2** (3): 269-74.
- Chikuma, S., M. Murakami, K. Tanaka and T. Uede (2000). "Janus kinase 2 is associated with a box 1-like motif and phosphorylates a critical tyrosine residue in the cytoplasmic region of cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4." *J Cell Biochem* **78** (2): 241-50.
- Chuang, E., M. L. Alegre, C. S. Duckett, P. J. Noel, M. G. Vander Heiden and C. B. Thompson (1997). "Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression." *J Immunol* **159** (1): 144-51.
- Chuang, E., T. S. Fisher, R. W. Morgan, M. D. Robbins, J. M. Duerr, M. G. Vander Heiden, J. P. Gardner, et al. (2000). "The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A." *Immunity* **13** (3): 313-22.
- Chuang, E., K. M. Lee, M. D. Robbins, J. M. Duerr, M. L. Alegre, J. E. Hambor, M. J. Neveu, et al. (1999). "Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases." *J Immunol* **162** (3): 1270-7.
- Cinek, T., A. Sadra and J. B. Imboden (2000). "Cutting edge: tyrosine-independent transmission of inhibitory signals by CTLA-4." *J Immunol* **164** (1): 5-8.
- Cordaro, T. A., K. E. de Visser, F. H. Tirion, T. N. Schumacher and A. M. Kruisbeek (2002). "Can the low-avidity self-specific T cell repertoire be exploited for tumor rejection?" *J Immunol* **168** (2): 651-60.

Coyle, A. J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Nguyen, et al. (2000). "The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses." *Immunity* **13** (1): 95-105.

Croft, M., L. M. Bradley and S. L. Swain (1994). "Naive 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* **152** (6): 2675-85.

Dariavach, P., M. G. Mattei, P. Golstein and M. P. Lefranc (1988). "Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains." *Eur J Immunol* **18** (12): 1901-5.

de Ines, C., B. Cochlovius, S. Schmidt, S. Kipriyanov, H. J. Rode and M. Little (1999). "Apoptosis of a human melanoma cell line specifically induced by membrane-bound single-chain antibodies." *J Immunol* **163** (7): 3948-56.

de Visser, K. E., T. A. Cordaro, D. Kioussis, J. B. Haanen, T. N. Schumacher and A. M. Kruisbeek (2000). "Tracing and characterization of the low-avidity self-specific T cell repertoire." *Eur J Immunol* **30** (5): 1458-68.

Doherty, P. C., R. M. Zinkernagel and I. A. Ramshaw (1974). "Specificity and development of cytotoxic thymus-derived lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis." *J Immunol* **112** (4): 1548-52.

Dong, C., A. E. Juedes, U. A. Temann, S. Shresta, J. P. Allison, N. H. Ruddle and R. A. Flavell (2001). "ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function." *Nature* **409** (6816): 97-101.

Dong, H., G. Zhu, K. Tamada and L. Chen (1999). "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion." *Nat Med* **5** (12): 1365-9.

Doyle, A. M., A. C. Mullen, A. V. Villarino, A. S. Hutchins, F. A. High, H. W. Lee, C. B. Thompson, et al. (2001). "Induction of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) restricts clonal expansion of helper T cells." *J Exp Med* **194** (7): 893-902.

Dranoff, G., E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, et al. (1993). "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (8): 3539-43.

Dunussi-Joannopoulos, K., H. J. Weinstein, R. J. Arceci and J. M. Croop (1997). "Gene therapy with B7.1 and GM-CSF vaccines in a murine AML model." *J Pediatr Hematol Oncol* **19** (6): 536-40.

Eagar, T. N., N. J. Karandikar, J. A. Bluestone and S. D. Miller (2002). "The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance." *Eur J Immunol* **32** (4): 972-81.

Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." *Immunity* **16** (1): 23-35.

Foulds, K. E., L. A. Zenewicz, D. J. Shedlock, J. Jiang, A. E. Troy and H. Shen (2002). "Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses." *J Immunol* **168** (4): 1528-32.

Fraser, J. D. and A. Weiss (1992). "Regulation of T-cell lymphokine gene transcription by the accessory molecule CD28." *Mol Cell Biol* **12** (10): 4357-63.

- Fraser, J. H., M. Rincon, K. D. McCoy and G. Le Gros (1999). "CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells." *Eur J Immunol* **29** (3): 838-44.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." *J Exp Med* **192** (7): 1027-34.
- Fukao, T. (2002). "Dendritic-cell-based anticancer vaccination: has it matured?" *Trends Immunol* **23** (5): 231-2.
- Gett, A. V. and P. D. Hodgkin (2000). "A cellular calculus for signal integration by T cells." *Nat Immunol* **1** (3): 239-44.
- Gomes, N. A., C. R. Gattass, V. Barreto-De-Souza, M. E. Wilson and G. A. DosReis (2000). "TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar." *J Immunol* **164** (4): 2001-8.
- Gong, J., D. Chen, M. Kashiwaba and D. Kufe (1997). "Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells." *Nat Med* **3** (5): 558-61.
- Gonzalo, J. A., T. Delaney, J. Corcoran, A. Goodearl, J. C. Gutierrez-Ramos and A. J. Coyle (2001a). "Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation." *J Immunol* **166** (1): 1-5.
- Gonzalo, J. A., J. Tian, T. Delaney, J. Corcoran, J. B. Rottman, J. Lora, A. Al-garawi, et al. (2001b). "ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses." *Nat Immunol* **2** (7): 597-604.
- Greene, J. L., G. M. Leytze, J. Emswiler, R. Peach, J. Bajorath, W. Cosand and P. S. Linsley (1996). "Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions." *J Biol Chem* **271** (43): 26762-71.
- Greenwald, R. J., M. A. Oosterwegel, D. van der Woude, A. Kubal, D. A. Mandelbrot, V. A. Boussiotis and A. H. Sharpe (2002). "CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response." *Eur J Immunol* **32** (2): 366-73.
- Gribben, J. G., G. J. Freeman, V. A. Boussiotis, P. Rennert, C. L. Jellis, E. Greenfield, M. Barber, et al. (1995). "CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (3): 811-5.
- Griffin, M. D., D. K. Hong, P. O. Holman, K. M. Lee, M. J. Whitters, S. M. O'Herrin, F. Fallarino, et al. (2000). "Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152)." *J Immunol* **164** (9): 4433-42.
- Guntermann, C. and D. R. Alexander (2002). "CTLA-4 Suppresses Proximal TCR Signaling in Resting Human CD4(+) T Cells by Inhibiting ZAP-70 Tyr(319) Phosphorylation: A Potential Role for Tyrosine Phosphatases." *J Immunol* **168** (9): 4420-9.
- Harding, F. A., J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet and J. P. Allison (1992). "CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." *Nature* **356** (6370): 607-9.
- Harper, K., C. Balzano, E. Rouvier, M. G. Mattei, M. F. Luciani and P. Golstein (1991). "CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location." *J Immunol* **147** (3): 1037-44.

- Hayday, A. C. (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* **18**: 975-1026.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." *Annu Rev Immunol* **19**: 47-64.
- Ho, W. Y., M. P. Cooke, C. C. Goodnow and M. M. Davis (1994). "Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells." *J Exp Med* **179** (5): 1539-49.
- Holdorf, A. D., O. Kanagawa and A. S. Shaw (2000). "CD28 and T cell co-stimulation." *Rev Immunogenet* **2** (2): 175-84.
- Holopainen, P. M. and J. A. Partanen (2001). "Technical note: linkage disequilibrium and disease-associated CTLA4 gene polymorphisms." *J Immunol* **167** (5): 2457-8.
- Huang, A. Y., P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll and H. Levitsky (1994). "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens." *Science* **264** (5161): 961-5.
- Hurwitz, A. A., B. A. Foster, E. D. Kwon, T. Truong, E. M. Choi, N. M. Greenberg, M. B. Burg, et al. (2000). "Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic mouse model using CTLA-4 blockade." *Cancer Res* **60** (9): 2444-8.
- Hurwitz, A. A., T. J. Sullivan, R. A. Sobel and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (5): 3013-7.
- Hurwitz, A. A., T. F. Yu, D. R. Leach and J. P. Allison (1998). "CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (17): 10067-71.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos and R. A. Kroccek (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." *Nature* **397** (6716): 263-6.
- Iezzi, G., K. Karjalainen and A. Lanzavecchia (1998). "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells." *Immunity* **8** (1): 89-95.
- Iida, T., H. Ohno, C. Nakaseko, M. Sakuma, M. Takeda-Ezaki, H. Arase, E. Kominami, et al. (2000). "Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells." *J Immunol* **165** (9): 5062-8.
- Irving, B. A. and A. Weiss (1991). "The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways." *Cell* **64** (5): 891-901.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara and T. Honjo (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." *Embo J* **11** (11): 3887-95.
- Jäger, E., D. Jäger and A. Knuth (2002). "Clinical cancer vaccine trials." *Curr Opin Immunol* **14** (2): 178-82.
- Jeannin, P., N. Herbault, Y. Delneste, G. Magistrelli, S. Lecoanet-Henchoz, G. Caron, J. P. Aubry, et al. (1999). "Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming." *J Immunol* **162** (4): 2044-8.

Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuetttenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." *J Exp Med* **193** (11): 1285-94.

Judd, B. A. and G. A. Koretzky (2000). "Antigen specific T lymphocyte activation." *Rev Immunogenet* **2** (2): 164-74.

June, C. H., J. A. Bluestone, L. M. Nadler and C. B. Thompson (1994a). "The B7 and CD28 receptor families." *Immunol Today* **15** (7): 321-31.

June, C. H., P. Vandenberghe and C. B. Thompson (1994b). "The CD28 and CTLA-4 receptor family." *Chem Immunol* **59**: 62-90.

Karandikar, N. J., T. N. Eagar, C. L. Vanderlugt, J. A. Bluestone and S. D. Miller (2000). "CTLA-4 downregulates epitope spreading and mediates remission in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **109** (2): 173-80.

Karandikar, N. J., C. L. Vanderlugt, J. A. Bluestone and S. D. Miller (1998). "Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease." *J Neuroimmunol* **89** (1-2): 10-8.

Karandikar, N. J., C. L. Vanderlugt, T. L. Walunas, S. D. Miller and J. A. Bluestone (1996). "CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease." *J Exp Med* **184** (2): 783-8.

Kato, T. and H. Nariuchi (2000). "Polarization of naive CD4+ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation." *J Immunol* **164** (7): 3554-62.

Kearney, E. R., T. L. Walunas, R. W. Karr, P. A. Morton, D. Y. Loh, J. A. Bluestone and M. K. Jenkins (1995). "Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4." *J Immunol* **155** (3): 1032-6.

Kikuchi, T., Y. Akasaki, M. Irie, S. Homma, T. Abe and T. Ohno (2001). "Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells." *Cancer Immunol Immunother* **50** (7): 337-44.

Konig, R. (2002). "Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR." *Curr Opin Immunol* **14** (1): 75-83.

Krebber, A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H. R. Bosshard and A. Pluckthun (1997). "Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system." *J Immunol Methods* **201** (1): 35-55.

Krummel, M. F. and J. P. Allison (1995). "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation." *J Exp Med* **182** (2): 459-65.

Krummel, M. F. and J. P. Allison (1996). "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells." *J Exp Med* **183** (6): 2533-40.

Krummel, M. F., T. J. Sullivan and J. P. Allison (1996). "Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo." *Int Immunol* **8** (4): 519-23.

Kuhns, M. S., V. Epshteyn, R. A. Sobel and J. P. Allison (2000). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates the size, reactivity, and function of a primed pool of CD4+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (23): 12711-6.

Kuiper, H. M., M. Brouwer, P. S. Linsley and R. A. van Lier (1995). "Activated T cells can induce high levels of CTLA-4 expression on B cells." *J Immunol* **155** (4): 1776-83.

Kwon, E. D., B. A. Foster, A. A. Hurwitz, C. Madias, J. P. Allison, N. M. Greenberg and M. B. Burg (1999). "Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (26): 15074-9.

Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, et al. (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." *Nat Immunol* **2** (3): 261-8.

Leach, D. R., M. F. Krummel and J. P. Allison (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." *Science* **271** (5256): 1734-6.

Lee, W. T., G. Pasos, L. Cecchini and J. N. Mittler (2002). "Continued antigen stimulation is not required during CD4(+) T cell clonal expansion." *J Immunol* **168** (4): 1682-9.

Lemischka, I. R., D. H. Raulet and R. C. Mulligan (1986). "Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells." *Cell* **45** (6): 917-27.

Lenschow, D. J., T. L. Walunas and J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." *Annu Rev Immunol* **14**: 233-58.

Letourneur, F. and R. D. Klausner (1992). "Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon." *Science* **255** (5040): 79-82.

Leung, H. T., J. Bradshaw, J. S. Cleaveland and P. S. Linsley (1995). "Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail." *J Biol Chem* **270** (42): 25107-14.

Levings, M. K., R. Sangregorio and M. G. Roncarolo (2001). "Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function." *J Exp Med* **193** (11): 1295-302.

Lewis, R. S. (2001). "Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* **19**: 497-521.

Lindsten, T., K. P. Lee, E. S. Harris, B. Petryniak, N. Craighead, P. J. Reynolds, D. B. Lombard, et al. (1993). "Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells." *J Immunol* **151** (7): 3489-99.

Ling, V., P. W. Wu, H. F. Finnerty, M. J. Agostino, J. R. Graham, S. Chen, J. M. Jussiff, et al. (2001). "Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches." *Genomics* **78** (3): 155-68.

Ling, V., P. W. Wu, H. F. Finnerty, K. M. Bean, V. Spaulding, L. A. Fouser, J. P. Leonard, et al. (2000). "Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor." *J Immunol* **164** (4): 1653-7.

Linsley, P. S., J. Bradshaw, J. Greene, R. Peach, K. L. Bennett and R. S. Mittler (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." *Immunity* **4** (6): 535-43.

Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle and J. A. Ledbetter (1991). "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." *J Exp Med* **174** (3): 561-9.

Linsley, P. S., J. L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. A. Ledbetter and R. Peach (1994). "Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors." *Immunity* **1** (9): 793-801.

Linsley, P. S., J. L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J. A. Ledbetter, C. Anasetti and N. K. Damle (1992). "Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes." *J Exp Med* **176** (6): 1595-604.

Luhder, F., P. Hoglund, J. P. Allison, C. Benoist and D. Mathis (1998). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes." *J Exp Med* **187** (3): 427-32.

Mages, H. W., A. Hutloff, C. Heuck, K. Buchner, H. Himmelbauer, F. Oliveri and R. A. Kroczek (2000). "Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand." *Eur J Immunol* **30** (4): 1040-7.

Maier, C. C. and M. I. Greene (1998). "Biochemical features of anergic T cells." *Immunol Res* **17** (1-2): 133-40.

Maloy, K. J. and F. Powrie (2001). "Regulatory T cells in the control of immune pathology." *Nat Immunol* **2** (9): 816-22.

Mandelbrot, D. A., A. J. McAdam and A. H. Sharpe (1999). "B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)." *J Exp Med* **189** (2): 435-40.

Marengere, L. E., P. Waterhouse, G. S. Duncan, H. W. Mittrucker, G. S. Feng and T. W. Mak (1996). "Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4." *Science* **272** (5265): 1170-3.

Masteller, E. L., E. Chuang, A. C. Mullen, S. L. Reiner and C. B. Thompson (2000). "Structural analysis of CTLA-4 function in vivo." *J Immunol* **164** (10): 5319-27.

Mattern, T., A. Thanhauser, N. Reiling, K. M. Toellner, M. Duchrow, S. Kusumoto, E. T. Rietschel, et al. (1994). "Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes." *J Immunol* **153** (7): 2996-3004.

McAdam, A. J., T. T. Chang, A. E. Lumelsky, E. A. Greenfield, V. A. Boussiotis, J. S. Duke-Cohan, T. Chernova, et al. (2000). "Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells." *J Immunol* **165** (9): 5035-40.

McAdam, A. J., R. J. Greenwald, M. A. Levin, T. Chernova, N. Malenkovich, V. Ling, G. J. Freeman, et al. (2001). "ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching." *Nature* **409** (6816): 102-5.

Metzler, B., C. Burkhardt and D. C. Wraith (1999). "Phenotypic analysis of CTLA-4 and CD28 expression during transient peptide-induced T cell activation in vivo." *Int Immunol* **11** (5): 667-75.

Miyatake, S., C. Nakaseko, H. Umemori, T. Yamamoto and T. Saito (1998). "Src family tyrosine kinases associate with and phosphorylate CTLA-4 (CD152)." *Biochem Biophys Res Commun* **249** (2): 444-8.

Mokyr, M. B., T. Kalinichenko, L. Gorelik and J. A. Bluestone (1998). "Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice." *Cancer Res* **58** (23): 5301-4.

- Morgan, D. J., H. T. Kreuzel, S. Fleck, H. I. Levitsky, D. M. Pardoll and L. A. Sherman (1998). "Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity." *J Immunol* **160** (2): 643-51.
- Mumberg, D., P. A. Monach, S. Wanderling, M. Philip, A. Y. Toledano, R. D. Schreiber and H. Schreiber (1999). "CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (15): 8633-8.
- Nakaseko, C., S. Miyatake, T. Iida, S. Hara, R. Abe, H. Ohno, Y. Saito, et al. (1999). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail." *J Exp Med* **190** (6): 765-74.
- Nishimura, H., Y. Agata, A. Kawasaki, M. Sato, S. Imamura, N. Minato, H. Yagita, et al. (1996). "Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes." *Int Immunol* **8** (5): 773-80.
- Nishimura, H., T. Honjo and N. Minato (2000). "Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice." *J Exp Med* **191** (5): 891-8.
- Nishimura, H., N. Minato, T. Nakano and T. Honjo (1998). "Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses." *Int Immunol* **10** (10): 1563-72.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato and T. Honjo (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." *Immunity* **11** (2): 141-51.
- Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, et al. (2001). "Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice." *Science* **291** (5502): 319-22.
- O'Garra, A. (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." *Immunity* **8** (3): 275-83.
- Oaks, M. K., R. T. Penwell and A. J. Tector (1996). "Nucleotide sequence of the ACI rat CTLA-4 molecule." *Immunogenetics* **43** (3): 173-4.
- Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, et al. (1995). "Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins." *Science* **269** (5232): 1872-5.
- Ohno, K., M. Fujiki, T. S. Khatlani, H. Inokuma and T. Onishi (1999). "Cloning of feline cDNA encoding the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)." *J Vet Med Sci* **61** (11): 1241-4.
- Okkenhaug, K., L. Wu, K. M. Garza, J. La Rose, W. Khoo, B. Odermatt, T. W. Mak, et al. (2001). "A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals." *Nat Immunol* **2** (4): 325-32.
- Olsson, C., K. Riesbeck, M. Dohlsten, E. Michaelsson and K. Riebeck (1999). "CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cell blasts." *J Biol Chem* **274** (20): 14400-5.
- Overwijk, W. W., A. Tsung, K. R. Irvine, M. R. Parkhurst, T. J. Goletz, K. Tsung, M. W. Carroll, et al. (1998). "gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand." *J Exp Med* **188** (2): 277-86.
- Paradis, T. J., E. Floyd, J. Burkhit, S. H. Cole, B. Brunson, E. Elliott, S. Gilman, et al. (2001). "The anti-tumor activity of anti-CTLA-4 is mediated through its induction of IFN gamma." *Cancer Immunol Immunother* **50** (3): 125-33.

- Pawelec, G., H. Kalbacher, H. Pohla, M. Boshell, H. Max, H. Friccius, M. Adibzadeh, et al. (1994). "Requirements for stimulation or anergy induction in alloreactive human T cell clones." *Cell Immunol* **158** (1): 241-52.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X. X. Zheng, T. B. Strom and A. K. Abbas (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." *Immunity* **6** (4): 411-7.
- Pioli, C., L. Gatta, V. Ubaldi and G. Doria (2000). "Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor." *J Immunol* **165** (10): 5530-6.
- Pistillo, M. P., P. L. Tazzari, J. H. Ellis and G. B. Ferrara (2000). "Molecular characterization and applications of recombinant scFv antibodies to CD152 co-stimulatory molecule." *Tissue Antigens* **55** (3): 229-38.
- Pistillo, M. P., P. L. Tazzari, F. Stirpe, A. Bolognesi, L. Polito, P. Capanni, C. Pioli, et al. (2001). "Anti-CTLA-4 human scFv antibodies prevent T-cell activation in transplantation." *Transplant Proc* **33** (1-2): 285-7.
- Poljak, R. J. (1991). "Structure of antibodies and their complexes with antigens." *Mol Immunol* **28** (12): 1341-5.
- Prabhu Das, M. R., S. S. Zamvil, F. Borriello, H. L. Weiner, A. H. Sharpe and V. K. Kuchroo (1995). "Reciprocal expression of co-stimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation." *Eur J Immunol* **25** (1): 207-11.
- Rammensee, H. G., T. Friede and S. Stevanović (1995). "MHC ligands and peptide motifs: first listing." *Immunogenetics* **41** (4): 178-228.
- Ratts, R. B., L. R. Arredondo, P. Bittner, P. J. Perrin, A. E. Lovett-Racke and M. K. Racke (1999). "The role of CTLA-4 in tolerance induction and antigen administration cell differentiation in experimental autoimmune encephalomyelitis: i. v. antigen administration." *Int Immunol* **11** (12): 1889-96.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). "Immune inhibitory receptors." *Science* **290** (5489): 84-9.
- Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." *J Exp Med* **192** (2): 295-302.
- Riley, J. L., P. J. Blair, J. T. Musser, R. Abe, K. Tezuka, T. Tsuji and C. H. June (2001). "ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement." *J Immunol* **166** (8): 4943-8.
- Sagerstrom, C. G., E. M. Kerr, J. P. Allison and M. M. Davis (1993). "Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (19): 8987-91.
- Saha, B., S. Chattopadhyay, R. Germond, D. M. Harlan and P. J. Perrin (1998). "CTLA4 (CD152) modulates the Th subset response and alters the course of experimental Leishmania major infection." *Eur J Immunol* **28** (12): 4213-20.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12** (4): 431-40.
- Samoilova, E. B., J. L. Horton, H. Zhang, S. J. Khoury, H. L. Weiner and Y. Chen (1998). "CTLA-4 is required for the induction of high dose oral tolerance." *Int Immunol* **10** (4): 491-8.

Savage, C. O. and C. J. Brooks (1995). "Human vascular endothelial cells do not induce anergy in allogeneic CD4+ T cells unless costimulation is prevented." *Transplantation* **60** (7): 734-40.

Schneider, H. and C. E. Rudd (2000). "Tyrosine phosphatase SHP-2 binding to CTLA-4: absence of direct YVKM/YFIP motif recognition." *Biochem Biophys Res Commun* **269** (1): 279-83.

Schwartz, J. C., X. Zhang, A. A. Fedorov, S. G. Nathenson and S. C. Almo (2001). "Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex." *Nature* **410** (6828): 604-8.

Shevach, E. M., R. S. McHugh, C. A. Piccirillo and A. M. Thornton (2001). "Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells." *Immunol Rev* **182**: 58-67.

Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi (2002). "Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol*.

Shinohara, T., M. Taniwaki, Y. Ishida, M. Kawauchi and T. Honjo (1994). "Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1)." *Genomics* **23** (3): 704-6.

Shiratori, T., S. Miyatake, H. Ohno, C. Nakaseko, K. Isono, J. S. Bonifacio and T. Saito (1997). "Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2." *Immunity* **6** (5): 583-9.

Shrikant, P., A. Khoruts and M. F. Mescher (1999). "CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism." *Immunity* **11** (4): 483-93.

Smythe, J. A., P. D. Fink, G. J. Logan, J. Lees, P. B. Rowe and I. E. Alexander (1999). "Human fibroblasts transduced with CD80 or CD86 efficiently trans-costimulate CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HLA-restricted reactions: implications for immune augmentation cancer therapy and autoimmunity." *J Immunol* **163** (6): 3239-49.

Sotomayor, E. M., I. Borrello, E. Tubb, J. P. Allison and H. I. Levitsky (1999). "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 U S A* **96** (20): 11476-81.

Sperling, A. I., J. A. Auger, B. D. Ehst, I. C. Rulifson, C. B. Thompson and J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation." *J Immunol* **157** (9): 3909-17.

Stamper, C. C., Y. Zhang, J. F. Tobin, D. V. Erbe, S. Ikemizu, S. J. Davis, M. L. Stahl, et al. (2001). "Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses." *Nature* **410** (6828): 608-11.

Steiner, K., F. Moosig, E. Csernok, K. Selleng, W. L. Gross, B. Fleischer and B. M. Broker (2001). "Increased expression of CTLA-4 (CD152) by T and B lymphocytes in Wegener's granulomatosis." *Clin Exp Immunol* **126** (1): 143-50.

Steiner, K., I. Waase, T. Rau, M. Dietrich, B. Fleischer and B. M. Broker (1999). "Enhanced expression of CTLA-4 (CD152) on CD4+ T cells in HIV infection." *Clin Exp Immunol* **115** (3): 451-7.

Sullivan, T. J., J. J. Letterio, A. van Elsas, M. Mamura, J. van Amelsfort, S. Sharpe, B. Metzler, et al. (2001). "Lack of a role for transforming growth factor-beta in cytotoxic T lymphocyte antigen-4-mediated inhibition of T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (5): 2587-92.

- Swallow, M. M., J. J. Wallin and W. C. Sha (1999). "B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha." *Immunity* **11** (4): 423-32.
- Tafari, A., A. Shahinian, F. Bladt, S. K. Yoshinaga, M. Jordana, A. Wakeham, L. M. Boucher, et al. (2001). "ICOS is essential for effective T-helper-cell responses." *Nature* **409** (6816): 105-9.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* **192** (2): 303-10.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188** (2): 287-96.
- Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone and A. H. Sharpe (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." *Immunity* **3** (5): 541-7.
- Tivol, E. A., S. D. Boyd, S. McKeon, F. Borriello, P. Nickerson, T. B. Strom and A. H. Sharpe (1997). "CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice." *J Immunol* **158** (11): 5091-4.
- Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, et al. (2001). "B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells." *J Exp Med* **193** (7): 839-46.
- van der Merwe, P. A., D. L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley and S. J. Davis (1997). "CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics." *J Exp Med* **185** (3): 393-403.
- van Elsas, A., A. A. Hurwitz and J. P. Allison (1999). "Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation." *J Exp Med* **190** (3): 355-66.
- Van Parijs, L., Y. Refaeli, J. D. Lord, B. H. Nelson, A. K. Abbas and D. Baltimore (1999). "Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death." *Immunity* **11** (3): 281-8.
- van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens and S. P. Schoenberger (2001). "Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation." *Nat Immunol* **2** (5): 423-9.
- Vandenborre, K., S. W. Van Gool, A. Kasran, J. L. Ceuppens, M. A. Boogaerts and P. Vandenberghe (1999). "Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation." *Immunology* **98** (3): 413-21.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker and J. A. Bluestone (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." *J Exp Med* **183** (6): 2541-50.
- Walunas, T. L. and J. A. Bluestone (1998). "CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo." *J Immunol* **160** (8): 3855-60.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson, et al. (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* **1** (5): 405-13.
- Wang, H., C. Y. S. Charles, B. W. James, R. S. Balderas, J. Rosenberg, C. M. E. Huang and Z. Chen (1997). CD152 (CTLA-4) Workshop: Expression and function of CD152 on human T cells: a study using mouse anti human CD152 monoclonal antibody BNI3.1. New York, Garland Publishing Inc.

- Wang, S., G. Zhu, A. I. Chapoval, H. Dong, K. Tamada, J. Ni and L. Chen (2000). "Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS." *Blood* **96** (8): 2808-13.
- Wang, X. B., C. Y. Zheng, R. Giscoombe and A. K. Lefvert (2001). "Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on human peripheral T cells." *Scand J Immunol* **54** (5): 453-8.
- Waterhouse, P., M. F. Bachmann, J. M. Penninger, P. S. Ohashi and T. W. Mak (1997). "Normal thymic selection, normal viability and decreased lymphoproliferation in T cell receptor-transgenic CTLA-4-deficient mice." *Eur J Immunol* **27** (8): 1887-92.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4." *Science* **270** (5238): 985-8.
- Watts, T. H. and M. A. DeBenedette (1999). "T cell co-stimulatory molecules other than CD28." *Curr Opin Immunol* **11** (3): 286-93.
- Weiss, A. (1991). "Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function." *Annu Rev Genet* **25**: 487-510.
- Winter, G. and W. J. Harris (1993). "Humanized antibodies." *Immunol Today* **14** (6): 243-6.
- Wolthers, K. C., S. A. Otto, S. M. Lens, D. N. Kolbach, R. A. van Lier, F. Miedema and L. Meyaard (1996). "Increased expression of CD80, CD86 and CD70 on T cells from HIV-infected individuals upon activation in vitro: regulation by CD4+ T cells." *Eur J Immunol* **26** (8): 1700-6.
- Yang, Y. F., J. P. Zou, J. Mu, R. Wijesuriya, S. Ono, T. Walunas, J. Bluestone, et al. (1997). "Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages." *Cancer Res* **57** (18): 4036-41.
- Yashiro, Y., X. G. Tai, K. Toyo-oka, C. S. Park, R. Abe, T. Hamaoka, M. Kobayashi, et al. (1998). "A fundamental difference in the capacity to induce proliferation of naive T cells between CD28 and other co-stimulatory molecules." *Eur J Immunol* **28** (3): 926-35.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, S. D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, et al. (1999). "T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS." *Nature* **402** (6763): 827-32.

Wissenschaftlicher Werdegang

Uwe Speck

geboren 1972 in Hamburg

Studium

an der Universität Hamburg

1993 –1998

Studiengang Biochemie/Molekularbiologie

Oktober 1997

Diplomprüfung

Januar 1998 - Oktober 1998

Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut in der Abteilung Immunologie zum Thema:
“Kostimulatorische Moleküle in der allogenen T-Zellantwort gegen Tumorzellen”

seit November 1998

Doktorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Abteilung Immunologie zum Thema:
„Beeinflussung antigenspezifischer humaner T-Zellen durch die Blockade von CD152 (CTLA-4)“