

Aus der Klinik für Rheumatologie und Klinischer Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

Untersuchung der CD152 vermittelten Regulation  
der Effektorfunktionen von CD8 T-Lymphozyten

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Johannes Kolja Eberhard Hegel**

aus Berlin

- Gutachter:
1. Prof. Dr. rer. nat. M. Brunner-Weinzierl
  2. Prof. Dr. med. D. Dragun
  3. Prof. Dr. med. R. Tauber

Datum der Promotion: 11. Juli 2008

# Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Immunsystem .....	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem .....	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem .....	2
1.2	Lymphozyten .....	4
1.2.1	Die T-Zell-Aktivierung .....	4
1.2.2	T Zell Differenzierung .....	8
1.2.3	Zytotoxische Mechanismen von CD8 <sup>+</sup> T Lymphozyten .....	9
1.2.4	Der kostimulatorische Einfluss bei der Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T Lymphozyten .....	11
1.2.5	Viele aktivierte CD8 <sup>+</sup> T Zellen exprimieren CD152 auf der Oberfläche .....	13
1.2.6	Einflüsse von CD152 auf die proliferative Kapazität von T Zellen .....	14
1.3	Die CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszell-Entstehung .....	15
1.4	Einfluss von CD152 auf die IFN- $\gamma$ Regulation von CD8 <sup>+</sup> T Zellen .....	17
1.5	Einfluss von CD152 auf Effektorfunktionen von CD8 <sup>+</sup> T Zellen .....	18
1.6	Transkriptionelle Regulation der Effektormolekül-Produktion in CD8 <sup>+</sup> T Zellen .....	20
2	Zielsetzung der Arbeit .....	22
3	Material und Methoden .....	24
3.1	Material .....	24
3.1.1	Geräte .....	24
3.1.2	Kunststoffartikel und Zellkulturmaterialien .....	24
3.1.3	Puffer und Medien .....	25
3.1.4	Mäuse .....	26
3.1.5	Antikörper und Chemikalien .....	26
3.2	Methoden .....	27
3.2.1	Durchflusszytometrie .....	27
3.2.2	Markierung von Oberflächenantigenen .....	28
3.2.3	Markierung von intrazellulären Antigenen .....	28
3.2.4	Zytometrische Detektion phosphorylierter MAP-Kinase ERK .....	28
3.2.5	Anreicherung und Aktivierung der CD8 <sup>+</sup> T Lymphozyten .....	29
3.2.6	IFN- $\gamma$ Konzentrationsbestimmung mittels ELISA .....	30
3.2.7	In vivo Experimente .....	31

3.2.8	In vivo Zytotoxizitäts-Test .....	32
3.2.9	Retrovirale Transduktion primär stimulierter T-Lymphozyten .....	33
3.2.10	Gelelektrophorese und Western Blot.....	33
3.2.11	Reverse Transkription und PCR-Analysen.....	34
3.2.12	Statistische Analysen.....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
4.1	CD152 hemmt die IFN- $\gamma$ Sekretion von CD8 <sup>+</sup> T Zellen.....	36
4.2	CD152 verringert den Anteil IFN- $\gamma$ produzierender CD8 <sup>+</sup> T Zellen nach primärer in vitro Stimulation.....	38
4.2.1	Serologische CD152-Blockade erhöht die Anzahl IFN- $\gamma$ produzierender CD8 <sup>+</sup> T Zellen	39
4.2.2	Die hemmende Wirkung von CD152 auf die IFN- $\gamma$ Produktion von CD8 <sup>+</sup> T Zellen ist Zell-intrinsisch.....	42
4.3	Nach Restimulation ist die Effektor-Zytokin Produktion von CD152 <sup>-/-</sup> CD8 <sup>+</sup> T Zellen stark beschleunigt.....	44
4.4	Primäre in vivo Stimulation bestätigt die in vitro beobachtete CD152 vermittelte Hemmung der CD8 <sup>+</sup> Effektorpopulation .....	46
4.5	CD152 reguliert die Zytotoxizität individueller CD8 <sup>+</sup> T Zellen in vivo.....	48
4.6	Effekte von CD152 auf die Bildung von CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen .....	50
4.7	Die ERK Phosphorylierung in CD8 <sup>+</sup> T Zellen wird durch CD152 gehemmt.....	53
4.8	CD152 beeinflusst die transkriptionelle Regulation der Effektor-Molekül-Produktion in CD8 <sup>+</sup> T Zellen .....	56
4.8.1	Eomesodermin mRNA akkumuliert in CD152 defizienten CD8 <sup>+</sup> T Zellen .....	56
4.8.2	CD152 hemmt die Synthese des Eomesodermin-Proteins.....	57
4.8.3	CD152 nutzt den Transkriptionsfaktor Eomesodermin für die Regulation von Effektor-Zytokinen in CD8 <sup>+</sup> T Zellen .....	58
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
5.1	Die Wirkung von CD152 auf die Effektorzytokin-Produktion von CD8 <sup>+</sup> T Zellen ...	61
5.1.1	CD152 hemmt die IFN- $\gamma$ Produktion individueller CD8 <sup>+</sup> T Zellen.....	61
5.1.2	Einfluss von CD152 auf die Heterogenität der CD8 <sup>+</sup> T-Effektorzell-Population.....	64
5.2	CD152 vermittelte Effekte auf die Zytotoxizität von CD8 <sup>+</sup> T Zellen.....	65
5.3	Mögliche Wirkung von CD152 auf das T Zell Gedächtnis .....	67
5.4	Hemmender Einfluss von CD152 auf intrazelluläre Signalwege in CD8 <sup>+</sup> T Zellen...	71
5.4.1	CD152 inhibiert die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK.....	71

5.4.2	Selektive Hemmung der Expression von Eomesodermin.....	72
5.5	Ausblick .....	74
6	Zusammenfassung .....	77
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	79
8	Abkürzungen .....	89
9	Lebenslauf .....	94
10	Danksagung .....	95
11	Erklärung.....	96

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem höherer Wirbeltiere ist ein leistungsfähiger Schutzmechanismus, der vielfältige Abwehrstrategien sowohl gegen eindringende Pathogene als auch gegen entartete körpereigene Zellen bietet. Für diese Aufgabe nutzt das Immunsystem eine Vielzahl spezialisierter Zellen und von diesen produzierter Substanzen. Die Bildung und Differenzierung dieser Zellen findet in über den gesamten Körper verteilten spezialisierten Organen statt. Eine wichtige Eigenschaft des Immunsystems, die verhindert, dass gesunde Zellen und Gewebe angegriffen werden, ist die Erkennung und die damit verbundene Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Wenn dieser Mechanismus gestört ist, kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen, bei denen das Immunsystem schädliche Reaktionen gegen autologe Strukturen des eigenen Organismus induziert. Durch die ständige Überwachung der Differenzierung körpereigener Zellen und Gewebe kann das Immunsystem gegebenenfalls, z.B. bei einer Virusinfektion oder einem unkontrolliert wachsenden Tumor, mittels spezialisierter Lymphozyten gezielt infizierte oder maligne Körperzellen eliminieren. Auch die Fähigkeit, bei körperfremden Substanzen zwischen Pathogenen, wie z.B. Mikroorganismen, und harmlosen Stoffen, wie z.B. Nahrungsmittel-Antigenen oder Pollen, zu unterscheiden, ist eine wichtige Eigenschaft des Immunsystems. Störungen dieses Mechanismus können unter anderem zu allergischen Reaktionen führen.

Die Immunabwehr höherer Vertebraten kann grundsätzlich in zwei Anteile gegliedert werden die eng miteinander verknüpft sind: das angeborene und das erst durch Kontakt mit Antigenen erworbene, adaptive Immunsystem.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist evolutionsgeschichtlich deutlich älter als das adaptive und hat insbesondere die entscheidende Aufgabe, Infektionen direkt abzuwehren oder sie zumindest während der vier bis sieben Tage, die bis zum Einsetzen der spezifischen Immunantwort des adaptiven Immunsystems vergehen, in Schach zu halten. Da das angeborene Immunsystem keine klonale Expansion antigenspezifischer Lymphozyten

erfordert, beträgt die Induktionszeit lediglich wenige Minuten oder Stunden. Das angeborene Immunsystem nutzt für die Erkennung von Krankheitserregern Rezeptoren, die häufig vorkommende Merkmale auf Pathogenen erkennen, so genannte PAMPs (engl.: pathogen-associated molecular patterns). Hierzu zählen z.B. die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die Mannose-Rezeptoren, welche bestimmte Moleküle auf der Oberfläche von zahlreichen Bakterien und auch einigen Viren erkennen können (Janeway et al., 2005; Male et al., 2006).

Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind: Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Humorale Bestandteile sind alle löslichen Mediatoren, wie z.B. das Komplementsystem, aber auch Zytokine, wie z.B. IL-1 (Interleukin-1), IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$  (engl.: tumor necrosis factor- $\alpha$ ), die u.a. durch die Verstärkung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Gefäßendothel und durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität bestimmten Zelltypen, wie z.B. Granulozyten und Makrophagen, die Wanderung zum Ort der Entzündung ermöglichen (Janeway et al., 2005; Male et al., 2006). Dieser Mechanismus dient zugleich auch der Einwanderung der Zellen des adaptiven Immunsystems (s. Kapitel 1.1.2). Hinzu kommt, dass Makrophagen und dendritische Zellen auch als professionelle Antigen präsentierende Zellen (APZ) fungieren und damit entscheidend an der Auslösung und der anschließenden Steuerung der adaptiven Immunreaktion beteiligt sind. Zusätzlich gehören noch weitere Mechanismen, wie z.B. die Säureschutzschicht der Haut, die auch antimikrobielle Substanzen enthält, zur unspezifischen Immunabwehr (Delves and Roitt, 2000a; Delves and Roitt, 2000b; Janeway et al., 2005; Male et al., 2006).

### **1.1.2 Das adaptive Immunsystem**

Das adaptive Immunsystem, auch erworbenes Immunsystem genannt, unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem durch eine spezifische Erkennung und Abwehr infektiöser Mikroorganismen und durch die Bildung von Gedächtniszellen. Solche Zellen entstehen aufgrund eines ersten Kontaktes mit dem jeweiligen Pathogen. Als Folge davon liegen dann einige ihrer Gene in einem für eine schnelle Effektor-Molekül-Produktion konditionierten Methylierungsmuster vor. Dadurch werden die Effizienz und die Schnelligkeit der Immunreaktion bei wiederholtem Antigenkontakt entscheidend gesteigert. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, das so genannte PAMPs anhand determinierter Rezeptoren erkennt, ist das adaptive Immunsystem in der Lage, durch die Rekombination von Genen ein

immens großes Repertoire ( $>10^{13}$ ) antigenspezifischer Rezeptoren zu generieren (Janeway et al., 2005; Male et al., 2006).

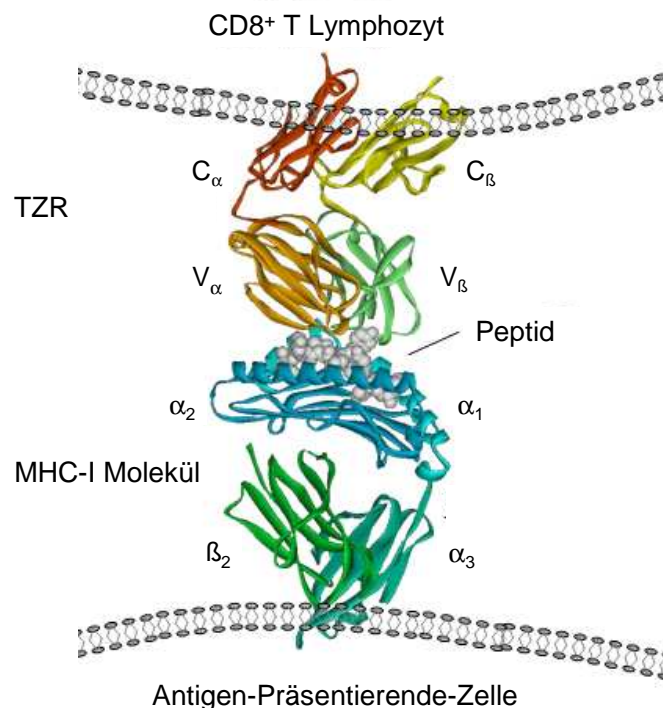
Die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind T- und B-Lymphozyten. Diese koordinieren ihre Immunantworten durch die Sekretion einer Vielzahl verschiedener Zytokine, wie z.B. IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$  (engl.: transforming growth factor- $\beta$ ) und TNF- $\alpha$ . Sie entstehen in einem adulten Organismus aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark und differenzieren sich in verschiedene Vorläuferzellen mit dann nur noch eingeschränktem Differenzierungspotential. Die Reifung der Lymphozyten aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle erfolgt in den primären lymphatischen Organen. B Zellen entwickeln sich im Knochenmark, T Zellen im Thymus. In den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und mukosaassoziierte lymphatische Gewebe) werden dann später die spezifischen Immunantworten durch die Interaktion mit den APZ ausgelöst. Antigene aus dem Blut werden zentral in der Milz, Antigene aus infizierten Geweben lokal in den drainierenden Lymphknoten durch die APZ aufgenommen und präsentiert. Über Epithelien aufgenommene Antigene werden dagegen durch APZ in mukosaassoziierten lymphatischen Geweben aufgenommen und prozessiert. Die somatische Rekombination von B- und T-Zell-Rezeptoren (BZR und TZR) ist in der Lage eine riesige Vielzahl an verschiedenen BZR- (ca.  $10^{11}$ ) und TZR- (ca.  $10^{13}$ ) Klonen zu generieren, die ein jeder für sich spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind. Während der klonalen Expansion, die bei einer Immunantwort ausgelöst wird, proliferieren insbesondere diejenigen Lymphozyten, die einen hochaffinen TZR bzw. BZR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Auf diese Weise werden solche Lymphozyten selektiert, die einen effektiven Schutz gegen das zu bekämpfende Pathogen sicherstellen. Dabei erfolgt die Beseitigung der pathologischen Antigene sowohl durch von den B Zellen sezernierte spezifische Antikörper, als auch durch die von den T Zellen vermittelte spezifische Immunantwort (siehe Abschnitt 1.2.1). Nach erfolgreichem Abschluss der spezifischen Immunreaktion überleben einige wenige selektierte Lymphozyten als Gedächtniszellen und gewährleisten auf diese Weise eine schnelle Reaktion bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen oder einem nah verwandten Erreger (Klebanoff et al., 2006; Wherry et al., 2003).



## 1.2 Lymphozyten

### 1.2.1 Die T-Zell-Aktivierung

T Lymphozyten stellen einen zentralen Bestandteil des adaptiven Immunsystems dar. Sie sind durch die Oberflächenexpression eines T-Zell-Rezeptors gekennzeichnet, der in vielerlei Hinsicht große Ähnlichkeiten mit Immunglobulin-Molekülen der humoralen Immunabwehr aufweist [zusammenfassend dargestellt in (Janeway et al., 2005; Male et al., 2006)]. Beide Molekül-Familien bestehen aus Paaren von Untereinheiten, die selber Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind, und beide erkennen mittels ihrer N-terminalen variablen Regionen eine Vielzahl an Antigenen. Im Gegensatz zu Immunglobulinen werden T-Zell-Rezeptoren nicht sezerniert. Außerdem erkennen sie ihr Antigen nur dann, wenn es MHC-restringiert (engl.: major histocompatibility complex) präsentiert wird und ein direkter Zell-Zell-Kontakt vorhanden ist.

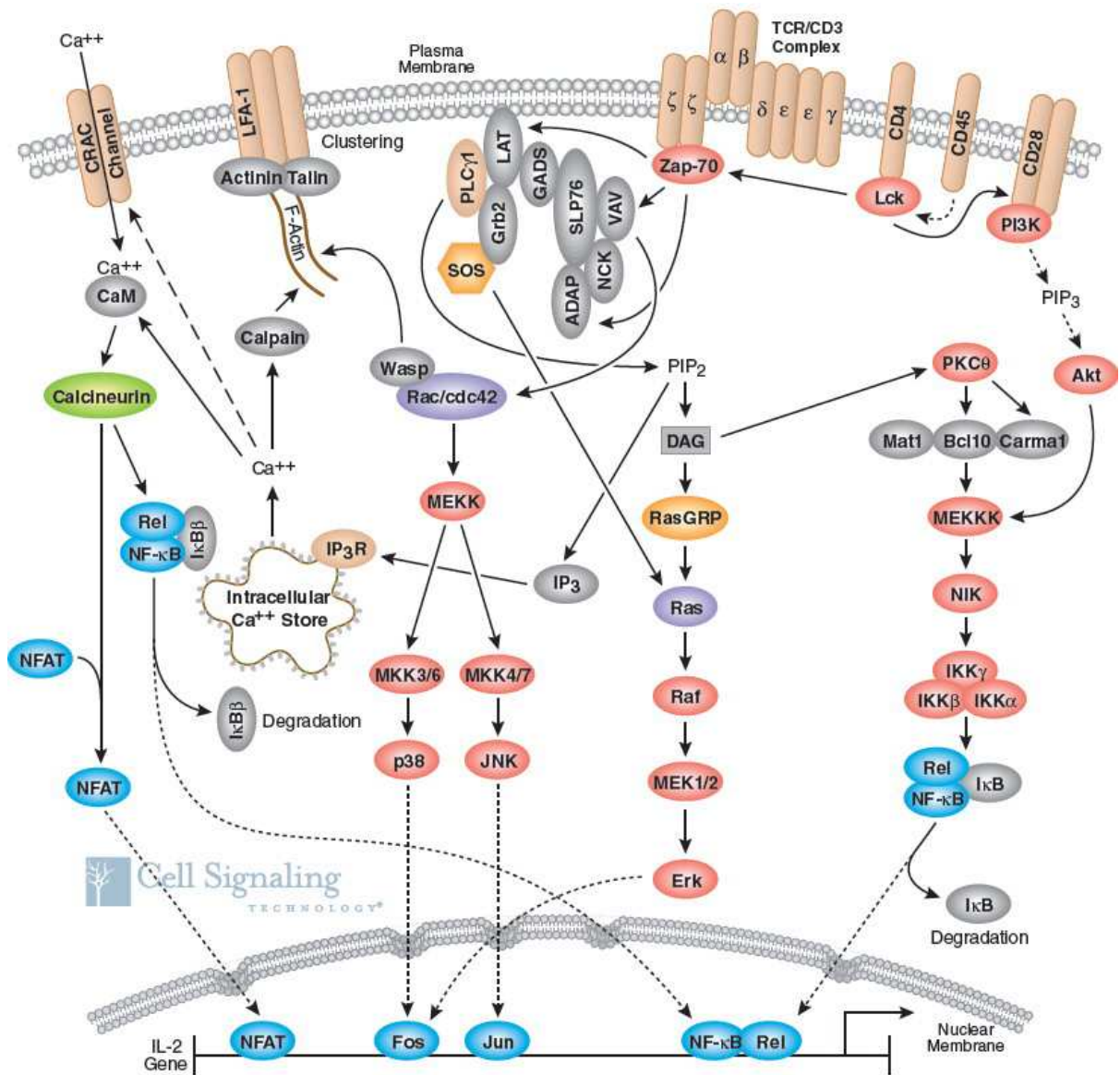


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Interaktion eines  $\alpha\beta$  T-Zell-Rezeptors einer CD8<sup>+</sup> T Zelle mit einem MHC-I-Peptid-Komplex auf einer APZ. In der Nische der  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Untereinheiten des MHC-I Moleküls wird der T Zelle ein Oktapeptid präsentiert, welches durch die variable Region des TZR ( $V_\alpha$  und  $V_\beta$ ) erkannt wird und zu einer antigenspezifischen Aktivierung der T Zelle führt.

Illustration adaptiert von: [www.bio.puc.cl](http://www.bio.puc.cl)

Das große Repertoire an Antigen-Bindungsstellen des TZR, auch CDRs (engl.: complementarity determining regions) genannt, wird, ähnlich denen der Immunglobuline, durch Rekombination der VDJ-Gene der variablen Region erzeugt. Der TZR ist ein Heterodimer, bestehend aus jeweils zwei variablen und zwei konstanten  $\alpha$ - (40-50 kDa) und  $\beta$ - (35-47 kDa) Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (**Abbildung 1**). Daneben existiert auch eine TZR-Variante, die aus  $\gamma$ - und  $\delta$ - Untereinheiten besteht. Über die Aufgaben der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist bisher wenig bekannt. Man findet sie vorwiegend in Epithelien des Darmes, aber auch des Fortpflanzungstrakts. Eine Besonderheit von  $\gamma\delta$ -T-Zellen liegt in der anscheinend möglichen direkten Aktivierung, die ohne eine MHC-restringierte Antigenpräsentation auskommt. Die intrazelluläre Weiterleitung des vom TZR ausgehenden Signals (illustriert in **Abbildung 2**) findet unter Mitwirkung von membranständigen Molekülen des CD3-Komplexes statt (Kane et al., 2000; Jordan et al., 2003). Dieser Komplex setzt sich aus Heterodimeren von jeweils einer  $\gamma\epsilon$ - und einer  $\delta\epsilon$ -Untereinheit sowie einem Homodimer, bestehend aus zwei  $\zeta$ -Ketten, zusammen. Die intrazellulären ITAMs (engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) dieser transmembranalen Moleküle werden innerhalb weniger Minuten nach Erkennung eines Antigen-MHC-Komplexes phosphoryliert und leiten dadurch die T-Zell-Aktivierung ein. Die phosphorylierten ITAMs dienen als Bindungsstellen für Kinasen, die SH-2 Domänen (engl.: Src-Homology domain 2) enthalten, wie z.B. Lck (P56<sup>Lck</sup>) und ZAP-70 (engl.: zeta-associated protein of 70 kDa). Aktiviertes ZAP-70 phosphoryliert daraufhin zahlreiche Adaptermoleküle, wie z.B. LAT (engl.: linker of activated T cells) und SLP-76 (engl.: SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa). Die phosphorylierten Tyrosinreste von LAT dienen dann als Bindungsstellen für diverse SH2-Domänen tragende Proteine wie Grb2, PI3K und PLC- $\gamma$ 1 (**Abbildung 2**). SLP-76, welches indirekt über den Adapter Gads auch mit LAT assoziiert ist, bindet zudem noch weitere Moleküle, die an der TZR-Signalkaskade beteiligt sind. Dieser so gebildete Multiproteinkomplex wird als Signalosom bezeichnet und ist entscheidend für die Weiterleitung des TZR-Signals verantwortlich (Werlen and Palmer, 2002). Die Aktivierung der im Signalosom vereinten Proteine führt daraufhin zur PKC Aktivierung und zur Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung, was wiederum die MAP-Kinase ERK (engl.: extracellular regulated kinase) und die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Im Resultat bewirkt diese komplexe Signalkaskade die gezielte Transkription bestimmter Gene, welche dann die Umlagerung des Zytoskeletts induzieren und so zur Bildung der immunologischen Synapse führen. Die immunologische Synapse entsteht aus der gezielten Gruppierung mehrerer T Zell

Rezeptoren, die von verschiedenen membranständigen Adhäsionsmolekülen umringt werden und so eine spezifische und stabile Signalweiterleitung ermöglichen. Auf diese Weise wird die Migration der T Zellen in das periphere Gewebe bewirkt (Lin and Weiss, 2001; Bentley and Mariuzza, 1996; Garcia et al., 1999; Weiss and Littman, 1994).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Signalwege nach der T-Zell-Stimulation durch den TZR-Komplex und der CD28 Kostimulation. Abgebildet sind verschiedene, bisher bekannte Signaltransduktionswege, die über die jeweiligen Kinasen (rot), Phosphatasen (grün) und Transkriptionsfaktoren (blau) vermittelt werden. Pfeile zeigen dabei eine direkt stimulatorische Wirkung an, gestrichelte Pfeile dagegen eine Translokation des dargestellten Faktors. Als Folge der Aktivierung dieser Signalwege wird die Transkription bestimmter Zielgene, wie beispielsweise IL-2, initiiert. Das hier gezeigte Schema ist repräsentativ sowohl für CD4<sup>+</sup> als auch für CD8<sup>+</sup> T Zellen.

Illustration adaptiert von: [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)

Die antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T Zell Aktivierung kann nur dann stattfinden, wenn der TZR-Komplex ein Antigen bindet, welches MHC-I-restringiert präsentiert wird. Während CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht-zelleigene - sowohl extrazelluläre als auch intravesikuläre - Antigene erkennen, welche MHC-II-restringiert präsentiert werden, können CD8<sup>+</sup> T Zellen nur durch Peptide stimuliert werden, die aus intrazellulären Proteinen prozessiert wurden und an MHC-I Moleküle gebunden sind. Im Gegensatz zu MHC-II Molekülen, die nur auf bestimmten Zellen des Immunsystems exprimiert werden, sind MHC-I Moleküle ubiquitär auf allen kernhaltigen somatischen Zellen zu finden (Watts and Powis, 1999). Das MHC-I Molekül besteht aus einer glykosylierten schweren Kette (45 kDa), die nicht-kovalent mit dem Polypeptid  $\beta_2$ -Mikroglobulin (12 kDa) assoziiert ist. Die schwere Kette des MHC-I ist in drei, jeweils ungefähr 90 Aminosäuren lange extrazelluläre Domänen unterteilt, die als  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  bezeichnet werden (Male et al., 2006). Die Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden durch zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices eine Nische, in der das antigene Peptid mit einer Länge von ca. 8-10 Aminosäuren bindet (vergleiche **Abbildung 1**).  $\alpha_3$  enthält eine Bindungsstelle für den Ko-Rezeptor CD8. Durch Varianzen der Aminosäuresequenz in der Peptid-Bindungs-Nische sind im Laufe der Evolution viele verschiedene MHC-I Haplotypen mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für bestimmte Peptide entstanden. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass Peptide verschiedener Krankheitserreger effektiv präsentiert werden können (Parham, 1996). Intrazelluläre Proteine, ob nun körpereigene, bakterielle oder virale, werden ständig im Proteasom in Peptide verdaut und mittels eines Transporters namens TAP (engl.: transporter associated with antigen processing) in das endoplasmatische Retikulum (ER) befördert. Dort werden neu synthetisierte  $\alpha$ -Ketten der MHC-I Moleküle, die durch die Bindung an das Chaperon-Protein Calnexin in einem partiell gefalteten Zustand gehalten werden, mittels des Adapter-Moleküls Tapasin in die Nähe des TAP-Peptid-Komplexes gebracht (Parham, 1996; Watts and Powis, 1999). Wenn die Bindungsaffinität des Peptids groß genug ist, löst sich das TAP-Protein, das Peptid bindet in der Nische des sich jetzt entfaltenden MHC-I Moleküls und gelangt anschließend über den Golgi-Apparat und Transportvesikel an die Zelloberfläche (Kloetzel, 2004). Allerdings können nur Peptide mit basischen oder hydrophoben Eigenschaften stabil auf den MHC-I Molekülen gebunden werden. Damit gewährleistet ist, dass alle zytosolischen Proteine, sowohl körpereigene als auch virale, in MHC-I-taugliche Peptide gespalten und dort präsentiert werden können, sind auf dem MHC-Gen-Lokus entsprechende Untereinheiten des Proteasoms kodiert, die die häufigere Abspaltung von Peptiden mit diesen Charakteristika unterstützen (Lehner and Cresswell, 2004).

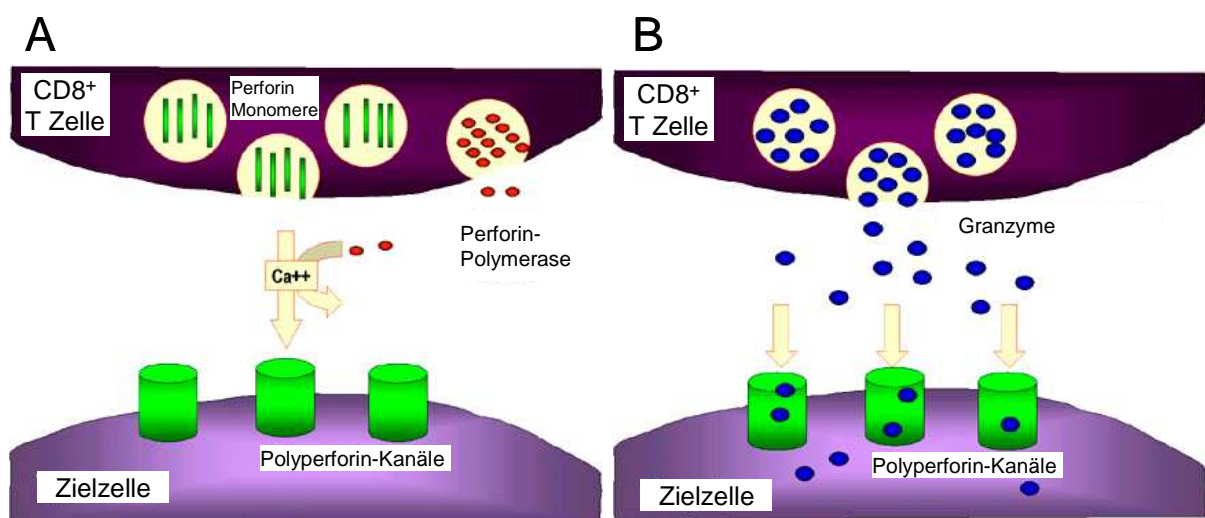
### 1.2.2 T Zell Differenzierung

T Lymphozyten lassen sich in verschiedene Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen einteilen. Eine erste grobe Unterscheidung reifer T Lymphozyten, die nach der Selektion den Thymus verlassen haben, lässt sich aufgrund der Oberflächenexpression der Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 vornehmen. CD4 und CD8 binden bei der Interaktion des TZR mit einem Antigen-MHC-Komplex an konstante Bereiche des MHC-Moleküls und gewährleisten auf diese Weise eine spezifische Aktivierung der T Zelle. Im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten, auch T-Helfer-Zellen (T<sub>h</sub>) genannt, die ihre Effektorfunktionen hauptsächlich über die Sekretion von Zytokinen auf andere Zellen ausüben, ist die Hauptaufgabe von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten, auch zytotoxische T Zellen (CTL) genannt, infizierte und maligne körpereigene Zellen zu erkennen und zu lysieren.

CD4<sup>+</sup> T Zellen können weiterhin in T<sub>h</sub>0, T<sub>h</sub>1, T<sub>h</sub>2, T<sub>h</sub>3, T<sub>h</sub>17 und T<sub>reg</sub> Subpopulationen unterteilt werden (Janeway et al., 2005; Male et al., 2006). Als T<sub>h</sub>0 Zellen werden naive undifferenzierte CD4<sup>+</sup> T Zellen bezeichnet. T<sub>h</sub>1 Zellen unterstützen durch ihre aktivierende Wirkung auf Makrophagen z.B. die Abwehr intrazellulärer Erreger (Cher and Mosmann, 1987). Im Gegensatz dazu helfen T<sub>h</sub>2 Zellen bei der Bekämpfung extrazellulärer Pathogene (Abbas et al., 1996; Romagnani, 1996). T<sub>h</sub>3 Zellen hemmen durch die Sekretion von TGF-β allgemein die Proliferation und Effektor-Funktionen von T Lymphozyten und sind so zusammen mit den regulatorischen T Lymphozyten (T<sub>reg</sub>) in der Lage, ungewollte oder fehlgeleitete Immunreaktionen zu unterdrücken (Abbas et al., 1996). T<sub>h</sub>17 Zellen sezernieren IL-17 und wurden in den vergangenen Jahren als wichtige Mediatoren bei der Steuerung von Th1 Antworten (Li et al., 2007) und der Kontrolle von Autoimmunität identifiziert (Gocke et al., 2007). Es gibt einige Studien verschiedener Forschergruppen, die darauf hinweisen, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Hilfe für die effektive Entwicklung von CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen von Bedeutung ist. Ob CD4<sup>+</sup> T-Zell-Hilfe während der initialen Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen tatsächlich notwendig ist, um sowohl eine effektive primäre Immunantwort zu entwickeln, wie auch langlebige Gedächtniszellen entstehen zu lassen, ist derzeit ein wichtiges Feld in der immunologischen Forschung (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003).

### 1.2.3 Zytotoxische Mechanismen von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten

Zytotoxische Zellen haben die Eigenschaft, Zellen zu lysieren. Zu ihnen gehören Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen), Eosinophile und CD8<sup>+</sup> T Zellen, von denen die zuletzt genannten die effektivsten zytotoxischen Zellen sind (Chen et al., 2005; Chen et al., 1994). CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten (CTL) beschädigen ihre Zielzellen u.a. durch Ausschütten von Granzymen und Perforin aus ihren intrazellulären Granula, die gezielt in die immunologische Synapse freigesetzt werden. Perforin lagert sich dabei in die Membran der Zielzelle ein und bildet tunnelähnliche Poren, durch die darauf folgend Granzyme und andere toxische Substanzen diffundieren können, wodurch es zur Aktivierung von Apoptose induzierenden Kaspasen und zur DNA-Degradierung kommt (**Abbildung 3**). Zytotoxische Zellen haben im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich selbst vor der toxischen Wirkung ihrer Effektormoleküle zu schützen (Male et al., 2006). Das Zell-permeabilisierende Perforin z.B. wird als inaktive Vorstufe synthetisiert. Erst durch das Abspalten eines 20 Aminosäuren langen Glykoproteins wird die Ca<sup>2+</sup>-Ionen-Bindungsstelle des Perforins freigegeben, die für eine Aktivierung benötigt wird. Niedrige Ca<sup>2+</sup> Konzentrationen in den Granula verzögern weiterhin die Aktivierung, die erst dann eintritt, wenn das Perforin in die immunologische Synapse zwischen CD8<sup>+</sup> T- und Zielzelle entlassen wird. Die höhere Ca<sup>2+</sup>-Ionen



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Perforin / Granzym Effektorfunktionen. **A)** Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T Zellen sezernieren Perforin-Monomere aus ihren Granula in die immunologische Synapse, welche daraufhin unter Mitwirkung von Perforin-Polymerase und Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu Polyperforin-Kanälen in den Membranen der Zielzellen polymerisieren. **B)** Durch die Polyperforin Kanäle können daraufhin die toxischen Moleküle und Enzyme (wie z.B. die Granzyme) hindurchdiffundieren und durch die Aktivierung von Kaspasen die Apoptose der Zielzelle induzieren.

Illustration adaptiert von: <http://pathmicro.med.sc.edu>

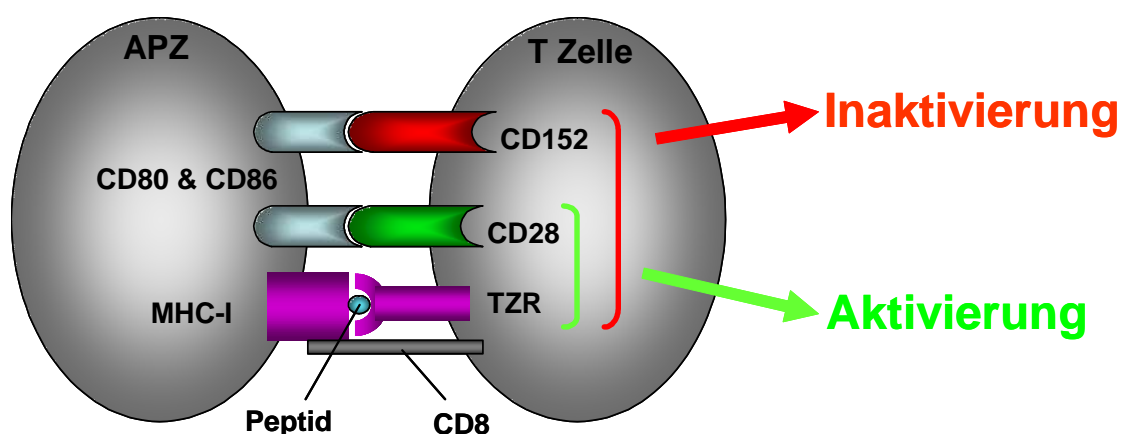
Konzentration führt in Verbindung mit Perforin-Polymerase-Enzymen außerhalb der Granula zu einer Konformationsänderung des Perforins, das daraufhin eine Phospholipid-Bindungsstelle ausbildet und sich in die Membran der Zielzelle einlagert. Erst in der Membran der Zielzelle polymerisieren die einzelnen Perforin-Untereinheiten zu Poren aus Polyperforin mit einem Durchmesser von ca. 16 nm (Janeway et al., 2005). Diese ermöglichen dann den Eintritt der Apoptose-induzierenden Granzyme.

Hinzu kommen weitere Mechanismen, die die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T Zellen vor ihren eigenen Waffen schützen, z.B. der Protease-Inhibitor PI-9, welcher vermehrt in zytotoxischen Zellen exprimiert wird und die Aktivität des Granzym-B herabsetzt (Hirst et al., 2003). Auch das Protein cFLIP (engl.: cellular Fas-associated death domain-like IL-1 converting enzyme inhibitory protein) sorgt durch die Hemmung der Aufspaltung von Kaspase-8 in seine Untereinheiten für eine verminderte Apoptose-Induktion über diese Signalkaskade (de Hooge et al., 2007; Taylor et al., 2001). Die Rolle einer membrangebundenen Form des Cathepsin-B beim Schutz gegen die Wirkung des Perforins ist umstritten (Baran et al., 2006; Catalfamo and Henkart, 2003). Cathepsin-B akkumuliert gezielt in der Membran der CD8<sup>+</sup> T Zelle an der immunologischen Synapse und könnte dort das anfallende Perforin in inaktive Untereinheiten aufspalten.

Zusätzlich trägt die Ausschüttung von nicht in den Granula gespeicherten Zytokinen und die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle zur Schädigung der Zielzellen bei. Hier sind insbesondere Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie (TNF) zu nennen. Durch die Bindung von Fas (CD95) und des TNFR-1 (CD120a) auf der Zielzelle wird eine Signalkaskade von Kaspasen aktiviert, die letztlich zur Apoptose der Zielzelle führt. Hierbei trimerisieren diese Rezeptoren und die an die intrazellulären Enden gebundenen Todesdomänen (engl.: death domains) aktivieren die Adaptermoleküle FADD (engl.: Fas associated protein via death domain) und TRADD (engl.: TNFRSF1A associated protein via death domain). Dies führt zur Aktivierung der Kaspasen 8 und 10, die sowohl die Degradierung der DNA beginnen, als auch die Membran-Permeabilität für Ca<sup>2+</sup>-Ionen erhöhen und dadurch zur Apoptose in der Zielzelle führen (Janeway et al., 2005; Male et al., 2006).

### 1.2.4 Der kostimulatorische Einfluss bei der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten

Die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten wird durch die Interaktion ihrer TZR mit MHC-I Molekülen, welche ein antigenes Peptid gebunden haben, initiiert. Für eine effektive antigenspezifische Aktivierung muss das Peptid passend für den jeweiligen TZR der CD8<sup>+</sup> T Zelle sein. Die resultierende Immunantwort der T Zelle hängt jedoch zu einem großen Teil von Signalen ab, die gleichzeitig über Korezeptoren vermittelt werden (Mueller et al., 1989; Sharpe and Freeman, 2002). Hier sind insbesondere die beiden Liganden CD80 und CD86 zu nennen, die zu den Rezeptoren der B7-Familie gehören. Diese primären Korezeptoren, die auf der Oberfläche von Antigen präsentierenden Zellen exprimiert werden, binden beim Zellkontakt an die strukturell homologen Liganden CD28 und CD152 auf CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 4**). Zusätzlich sind gegenwärtig noch 5 weitere Moleküle bekannt, die zu der B7-Rezeptor-Familie gehören, aber nicht an CD28 oder CD152 binden: ICOS-L (engl.: inducible costimulator ligand), PD-L1 (engl.: programmed death ligand 1), PD-L2 (engl.: programmed death ligand 2), B7-H3 und B7-H4 (Collins et al., 2005). CD28 und CD152 gehören beide zur Familie der Immunglobulin-Oberflächenrezeptoren und werden auf fast allen T Zellen exprimiert (Alegre et al., 2001). Im Gegensatz zu CD28, das konstitutiv auf der Oberfläche vorhanden ist und Immunantworten verstärkt, ist CD152 erst nach der T Zell Stimulation auf der Oberfläche detektierbar und vermindert die Aktivierung von T Zellen (Lindsten et al., 1993; Walunas et al., 1994). Außerdem besitzt CD152 eine um etwa 50- bis 100-fach höhere



**Abbildung 4:** Schematische Illustration der Interaktion wichtiger kostimulatorischer bzw. koinhibitorischer Oberflächenmoleküle bei der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T Zell Aktivierung. Während der Interaktion des TZR mit dem Antigen-MHC-Komplex auf APZ steuern die homologen Oberflächenmoleküle CD28 und CD152 den Ausgang der Immunantwort der T Zelle.



Bindungsaffinität zu den Rezeptoren CD80 und CD86 als CD28 (van der Merwe et al., 1997; Linsley et al., 1995).

Die inhibitorische Wirkung von CD152 auf T Zellen wird durch den Phänotyp der CD152<sup>-/-</sup> Mäuse deutlich. Diese Tiere leiden an einer lymphoproliferativen Fehlfunktion, bei der aktivierte T Zellen sämtliche Organe infiltrieren und ultimativ zu einem frühen Tod 3 bis 4 Wochen nach der Geburt führen (Waterhouse et al., 1995; Tivol et al., 1995). Hervorgerufen wird dieses hyperreaktiv agierende Immunsystem durch ein im gesamten Organismus vorherrschendes proinflammatorisches Zytokinmilieu, welches durch Immunreaktionen gegen diverse Autoantigene verursacht wird (Chambers et al., 1997; Chambers et al., 1998).

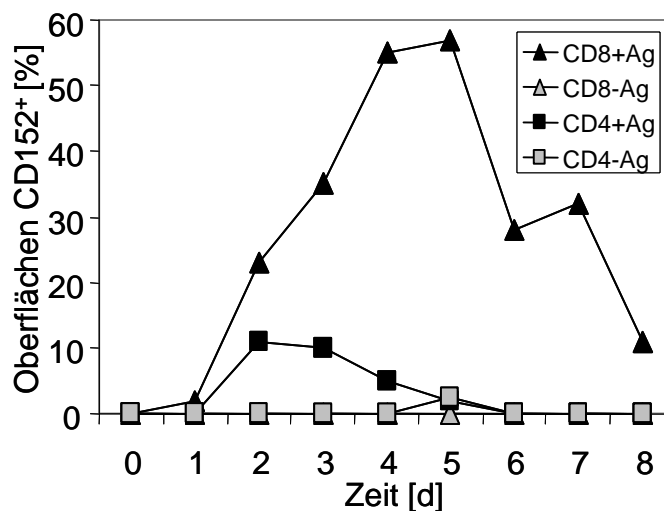
Verschiedene Mechanismen sind bisher für die supprimierende Wirkung von CD152 auf T Zellen vorgeschlagen worden, z.B.: Konkurrenz um die Bindung von CD28 zu CD80/CD86 auf APZs (Masteller et al., 2000), Unterbrechung der CD28 Lokalisation in der immunologischen Synapse (Pentcheva-Hoang et al., 2004) und intrazelluläre CD152 vermittelte Signaltransduktion durch die Phosphatasen SHP-2 und PP2A (Chuang et al., 2000; Cilio et al., 1998; Marengere et al., 1996). Neuere Studien deuten auch auf eine Verkürzung der Kontaktzeiten zwischen T Zellen und APZ durch CD152 hin (Schneider et al., 2006). Außerdem scheint CD152 auch eine wichtige Funktion bei der Induktion der T Zell Polarisation zu spielen, wodurch es in der Lage wäre, die Adhäsion und Zellmotilität zu beeinflussen (Wei et al., 2007). Ergebnisse, die unter suboptimal stimulatorischen Konditionen gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass CD152 die frühen Stadien der TZR-Signale durch Behinderung der Assimilation der Membran-gebundenen „lipid rafts“, durch Inhibition der Akkumulation von IL-2 mRNA, durch Verhinderung der Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT und durch einen Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase hemmt (Brunner et al., 1999; Chambers et al., 1997; Martin et al., 2001). Weitere Studien zeigen, dass die CD152 vermittelte Signaltransduktion auch die Phosphorylierung von ERK (engl.: extracellular regulated kinase) unterhalb des TZR und von ZAP-70 hemmt (vergleiche **Abbildung 2**) (Calvo et al., 1997; Schneider et al., 2002).

Da die meisten Studien bisher auf die in CD152-defizienten Mäusen hoch aktivierten CD4<sup>+</sup> T Zellen fokussiert waren, ist die Funktion von CD152 in CD8<sup>+</sup> T Zell Populationen nicht gut verstanden. Es ist in verschiedenen Publikationen nachgewiesen worden, dass die Tumorabwehr durch die Behandlung mit anti-CD152 Antikörpern verstärkt wird (Leach et al., 1996). Diese Ergebnisse deuten auf eine zentrale Rolle von CD152 in zytotoxischen

Lymphozyten hin. Weil ein größerer Prozentsatz von  $CD8^+$  T Zellen CD152 auf der Oberfläche exprimiert, verglichen zu  $CD4^+$  T Zellen (**Abbildung 5**), und weil sie einen größeren Beitrag zur Produktion des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  leisten, könnte dies ihre Wichtigkeit bei der CD152-vermittelten Steuerung von Immunreaktionen unterstreichen. Aufgrund ihrer zytotoxischen Fähigkeiten gegen entartete körpereigene Zellen einerseits und der Verschonung gesunder Zellen andererseits vermitteln  $CD8^+$  T Zellen wichtige Effektorfunktionen des Immunsystems. Bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, könnten  $CD8^+$  T Zellen daher viele der chronisch entzündlichen Immunreaktionen vermitteln und, bzw. oder, aufrechterhalten (Arai et al., 1998; Berner et al., 2000; Skapenko et al., 2005). Die Bedeutung der von  $CD8^+$  T Zellen ausgeführten inflammatorischen Immunantworten bei rheumatoiden Erkrankungen ist bisher allerdings noch nicht ausreichend erforscht.

### 1.2.5 Viele aktivierte $CD8^+$ T Zellen exprimieren CD152 auf der Oberfläche

CD152 wird nicht auf der Oberfläche von ruhenden T Zellen exprimiert. Selbst nach Stimulation der T Zellen ist es aufgrund der geringen Expression bezogen pro Zelle schwierig nachzuweisen (Egen and Allison, 2002; Krummel and Allison, 1996; Walunas et al., 1996).



**Abbildung 5:** CD152 Oberflächenexpression auf  $CD4^+$  (Viereck) und  $CD8^+$  (Dreieck) T Lymphozyten nach antigenspezifischer Primärstimulation. Zellen wurden an den angegebenen Zeitpunkten auf CD152 Oberflächenexpression analysiert. Schwarz gefüllte Symbole zeigen die Prozente der CD152 positiven T Zellen in Kulturen mit Antigen (Ag), grau gefüllte Symbole auf T Zellen unstimulierter Kulturen.

Daten aus: (Pandiyani et al., 2007).

Um in der Lage zu sein, CD152 auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen zu analysieren, wurde die im gleichen Institut entwickelte modifizierte Liposomen-Färbetechnik für die Durchflusszytometrie angewendet (Scheffold et al., 2000). Dadurch konnte die Sensitivität der CD152 Färbung um ungefähr das 1000-fache verstärkt werden (Gartner et al., 2006). Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, eine CD152 Expressionskinetik auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen durchzuführen. **Abbildung 5** zeigt, dass nach primärer Stimulation die Anzahl CD152 oberflächen-positiver CD8<sup>+</sup> T Zellen auf das ca. 2- bis 6-fache gleichzeitig stimulierter CD4<sup>+</sup> T Zellen ansteigt (Pandiyani et al., 2007). Im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T Zellen, bei denen das Maximum der CD152-Expression an den Tagen 2-3 bei höchstens 12% gefunden wurde, erreichten bis zu 60% der CD8<sup>+</sup> T Zellen ihre CD152-Expression zwischen den Tagen 4-5. Zusätzlich war beobachtet worden, dass die Dauer der CD152-Expression auf CD8<sup>+</sup> T Zellen nach primärer Aktivierung signifikant verlängert war.

Bisher sind, ausser IL-2, welches eine leichte Anhebung der membranständigen Expression von CD152 hervorrufen kann, keine Zytokine bekannt, die die Oberflächenexpression von CD152 beeinflussen (Alegre et al., 1996). Die vergleichsweise stärkere CD152 Expression auf CD8<sup>+</sup> T Zellen war unabhängig von der Zugabe von exogenem IL-2 zu den CD8<sup>+</sup> T-Zell-Kulturen und eine Variation der IL-2 Konzentration in der Zellkultur hatte keinen Einfluss auf die hemmenden Effekte von (siehe auch Kapitel 4.1).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die CD152 Oberflächenexpression durch zellintrinsische Mechanismen reguliert wird und dass CD152 eine prominentere Rolle bei der Stimulation von CD8<sup>+</sup>- im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>-T Zellen hat. Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es deshalb, Effekte von CD152 auf CD8<sup>+</sup> T Zellen zu untersuchen.

### **1.2.6 Einflüsse von CD152 auf die proliferative Kapazität von T Zellen**

Für eine effektive Beseitigung intrazellulärer Pathogene ist eine schnelle proliferative Expansion individueller antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T Zellen nötig. Nach der Expansions- und der anschließenden Effektorphase folgt die Kontraktion, in der fast alle CD8<sup>+</sup> T Zellen durch Apoptose sterben und nur eine kleine Population Gedächtniszellen überlebt. Wie gezeigt wurde, nimmt CD152 in manchen T-Zell-Subpopulationen Einfluss auf diesen Prozess, indem es die Zellen vor Apoptose schützt (Pandiyani et al., 2004). Versuche mit T<sub>h</sub>1- und T<sub>h</sub>2- CD4<sup>+</sup> T Zellen ergaben eine 4- bis 5-fach erhöhte CD152 Oberflächenexpression auf Th2 Zellen die mit einem Schutz dieser Subpopulation gegen den AICD (engl.: activation induced cell death)

einherging (Pandiyani et al., 2004). Die Apoptose wurde bei diesen Experimenten durch Nachweis von Phosphatidylserin auf der extrazellulären Membranseite und durch Nachweis des DNA-Abbaus in den Zellen gezeigt. Diese Apoptosezeichen scheinen durch die Aktivierung von Kaspasen, die frühe Mediatoren der Apoptose darstellen, vermittelt zu werden. Wie gezeigt wurde wird die Aktivierung von Kaspasen durch CD152 Signale gehemmt und über die Induktion der PI3K-Aktivität ausgelöst.

CD8<sup>+</sup> T Zellen dagegen scheinen, zumindest während der primären Immunantwort, nicht durch CD152-Signale in ihrer Proliferation gehemmt zu werden. Die Untersuchung der Proliferation von CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen nach antigenspezifischer Stimulation zeigte keinen Einfluss von CD152 darauf (Pandiyani et al., 2007). Inwieweit CD152 Einfluss auf die Proliferation und die Hemmung von Apoptose während sekundärer Stimulation nimmt, ist bisher nicht ausreichend untersucht.

### 1.3 Die CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszell-Entstehung

Während einer Immunantwort des adaptiven Immunsystems vervielfältigen sich die für den Erreger spezifischen CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten für eine effektive Bekämpfung des Pathogens in kürzester Zeit durch den Prozess der klonalen Expansion. Um eine Fortführung der Effektorfunktionen nach Beseitigung des Erregers zu vermeiden ist es notwendig, dass nach Beendigung einer Immunantwort fast alle der reaktiven T Zellen schnell und kontrolliert beseitigt werden. Dieser Mechanismus wird auch programmierte Kontraktion genannt und durch die gezielte Induktion von Apoptose kontrolliert. Lediglich eine kleine Population von CD8<sup>+</sup> T Zellen überlebt diese Kontraktionsphase und bildet so die CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen (T<sub>M</sub>), die in der Lage sind, bei wiederholtem Kontakt zum Pathogen schnell und effektiv zu reagieren (Kaech et al., 2002).

Eine unerlässliche Eigenschaft des T-Zell-Gedächtnisses besteht in der langfristigen Erhaltung des antigenspezifischen Reaktionsvermögens gegenüber den ursprünglich erkannten Erregern. CD8<sup>+</sup> T<sub>M</sub> Zellen können dabei grob in zwei sich in entscheidenden Eigenschaften unterscheidende Subpopulationen unterteilt werden. Zentrale-T-Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>) und Effektor-T-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) (Sallusto et al., 1999). CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> sind unter anderem durch einen CD62L<sup>high</sup> CD44<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> Phänotyp, CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> durch einen CD62L<sup>low</sup> CD44<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> Phänotyp gekennzeichnet. CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> können nach wiederholtem Antigenkontakt selbst keine Effektorfunktionen ausüben, beginnen

allerdings nach dem Kontakt schnell zu proliferieren und generieren auf diese Weise eine große Menge  $CD8^+$  T-Effektor-Zellen, welche in der Lage sind, schnell Effektor-Funktionen, wie beispielsweise Zytokinproduktion oder Zytotoxizität, auszuüben.  $CD8^+$   $T_{CM}$  stellen somit eine Art Reservoir dar, welches aufgrund einer hohen proliferativen Kapazität in der Lage ist, sekundäre Effektorzellen zu generieren, die selbst eine geringere proliferative Neigung zeigen. Dieses Modell wird durch die Tatsache unterstützt, dass  $CD8^+$   $T_{CM}$  eher in sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, etc.) anzutreffen sind.

$CD8^+$   $T_{EM}$  haben eine geringere proliferative Kapazität, können dafür allerdings schneller auf ihnen bekannte Pathogene reagieren. Sie sind in peripheren Geweben und Organen (Leber, Lunge, etc.) anzutreffen (Weninger et al., 2001; Wherry et al., 2003). Diese spezifische anatomische Verteilung der beiden Subpopulationen garantiert einen effektiven Schutz vor Pathogenen und malignen Zellen. Welche dieser  $CD8^+$  T-Gedächtniszell-Subpopulationen ein größeres Potential für Immunisierungstherapien bietet, wird derzeit debattiert (Klebanoff et al., 2004; Klebanoff et al., 2006; Manjunath et al., 2001; Weninger et al., 2001). Trotz der Fähigkeit von  $CD8^+$   $T_{EM}$ , schnelle Effektorfunktionen auszuüben (Zytokinsekretion und Zytotoxizität), scheinen  $T_{CM}$ , aufgrund ihrer größeren proliferativen Kapazität, vielversprechender für neue therapeutische Ansätze zu sein (Klebanoff et al., 2006).

Es ist bis heute nicht vollständig verstanden, welche Faktoren für eine effektive Entstehung eines  $CD8^+$  T Zell-Gedächtnisses erforderlich sind. Verschiedene Forschergruppen haben in den vergangenen Jahren die Notwendigkeit der  $CD4^+$  T Zell Hilfe demonstriert (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Allerdings ist zurzeit nicht geklärt, inwieweit  $CD4^+$  T Zellen bei der initialen Aktivierung, der Kontraktion nach der primären Immunantwort oder während beider Vorgänge nötig sind. Zudem existieren gegenwärtig verschiedene Differenzierungsmodelle für die Entstehung eines effektiven  $CD8^+$  T-Zell-Gedächtnisses. Das lineare Differenzierungsmodell beispielsweise vertritt die Sichtweise, dass nur  $CD8^+$  T Zellen, die zuvor in zytotoxische Effektor-Zellen differenziert waren in der Lage sind, sich zu Gedächtnis-Zellen zu entwickeln (Opferman et al., 1999). Dagegen wurde in anderen Studien demonstriert, dass die lineare Differenzierung zu Effektor-Zellen keine Voraussetzung für die Entstehung von  $CD8^+$  T-Gedächtniszellen darstellt (Manjunath et al., 2001). Ein wichtiges Ereignis das den Ausgang von  $CD8^+$  T Zell Immunantworten steuert, scheint vor allem auch die Dauer des initialen antigenen Stimulus zu sein. So wurde gezeigt, dass  $CD8^+$  T Zellen, die lediglich 4 h lang antigenspezifisch stimuliert worden waren,

geringere Effektorfunktionen und eine geringere Überlebensrate hatten, als Zellen, die 20 h lang stimuliert worden waren (van Stipdonk et al., 2003; Gett et al., 2003). Diese Daten unterstreichen die Wichtigkeit der initialen Stimulation naiver  $CD8^+$  T Zellen und deuten daraufhin, dass CD152 wegen seiner hemmenden Einflussnahme auf Effektorfunktionen bereits nach der primären T-Zell-Aktivierung auch eine wichtige Rolle für die Steuerung später Immunantworten zukommt.

## 1.4 Einfluss von CD152 auf die IFN- $\gamma$ Regulation von $CD8^+$ T Zellen

$CD8^+$  T Zellen üben ihre Immunantworten zum einen über direkten Zellkontakt mittels zytotoxischer Zelllyse aus, und zum anderen durch die Sekretion bestimmter Zytokine, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2. Das von  $CD8^+$  T Zellen vorherrschend produzierte Zytokin ist IFN- $\gamma$ . Diese proinflammatorische Schlüsselsubstanz induziert in verschiedensten Zielzellen sowohl spezifische als auch unspezifische Mechanismen der Immunabwehr (Dighe et al., 1994). Speziell IFN- $\gamma$  ist eines der zentralen Zytokine, welches für die Hochregulation von MHC-I und MHC-II Molekülen auf verschiedenen Zellen, wie z.B. Makrophagen und Epithel-Zellen, verantwortlich ist (Kamijo et al., 1993b; Refaeli et al., 2002). Hinzu kommt, dass dieses Zytokin die humorale Immunabwehr durch Einflussnahme auf den IgG Klassenwechsel der schweren Kette entscheidend beeinflusst (Bossie and Vitetta, 1991; Snapper and Paul, 1987). IFN- $\gamma$  reguliert außerdem die Produktion einer Reihe anderer proinflammatorischer Zytokine einschließlich IL-12 und TNF- $\alpha$  und stabilisiert dadurch den Verlauf entzündlicher T Zell Antworten (Das et al., 2001; Zhang et al., 2001).

In vivo wurde im Mausmodell gezeigt, dass durch die genetische Inaktivierung des IFN- $\gamma$  Rezeptors die Fähigkeit der Tiere, mikrobielle Infektionen abzuwehren, wie z.B. die von Listerien, des Vaccinia Virus oder verschiedener Mykobakterien, stark beeinträchtigt ist. Dies geschah trotz einer anscheinend normalen Immunantwort der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T Lymphozyten gegen diese Pathogene (Huang et al., 1993; Kamijo et al., 1993a; Buchmeier and Schreiber, 1985). In  $CD8^+$  T-Gedächtniszellen wurde zudem eine konstitutive Transkription des IFN- $\gamma$ -Gens beobachtet, die in naiven T Zellen nicht vorkommt (Bachmann et al., 1999). Auf diese Weise sind T-Gedächtniszellen schneller in der Lage IFN- $\gamma$  zu produzieren und damit auf eindringende Pathogene zu reagieren. Dabei sind u.a. die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT vom Zytosol in den Zellkern (Teixeira et al., 2005) und die Induktion der Transkriptionsfaktoren T-bet (Sullivan et al., 2003; Szabo et al.,

2002) und Eomesodermin (Glimcher et al., 2004; Pearce et al., 2003) wichtige Schritte für die Induktion der IFN- $\gamma$ -Gen-Transkription in diesen Zellen.

Es ist bereits länger bekannt, dass CD152 die Produktion verschiedener Effektor-Zytokine während einer Immunantwort beeinflusst. In früheren Studien wurde eine Hemmung proinflammatorischer Signalmoleküle, wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gezeigt, allerdings lediglich nach sekundärer Stimulation (Chambers et al., 1998). Dies spricht dafür, dass die regulatorische Rolle von CD152 lediglich in differenzierten CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten zum Tragen kommt. Die beobachteten Effekte auf die Effektor-Zytokinen-Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen nach wiederholtem Antigenkontakt sind jedoch enorm stark und deuten so auf eine zentrale regulatorische Funktion von CD152 hin. Welcher Mechanismen sich CD152 bedient, um seine inhibitorischen Eigenschaften auf die Effektor-Molekül Produktion auszuüben ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es existieren allerdings mehrere Möglichkeiten dafür, die bereits weitestgehend in Kapitel 1.2.4 beschrieben wurden (Chuang et al., 2000; Marengere et al., 1996; Masteller et al., 2000; Pentcheva-Hoang et al., 2004; Schneider et al., 2006). Interessant für die Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion sind dabei vor allem Befunde, dass CD152 die Signaltransduktion durch Behinderung der Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Zellkern und durch die Reduktion der Phosphorylierung von ERK hemmt (Brunner et al., 1999; Calvo et al., 1997; Schneider et al., 2002). Auch neue Studien, die zeigen, dass CD152 die Kontaktdauer zwischen T Zellen und APZ reduziert (Schneider et al., 2006) geben wichtige Hinweise auf den Mechanismus der CD152 vermittelten Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion.

## **1.5 Einfluss von CD152 auf Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T Zellen**

Die regulatorische Kapazität von CD152, legt einen Einsatz bei der Immunotherapie von Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen und unkontrolliert proliferierenden malignen Zellen nahe (Leach et al., 1996; Shrikant et al., 1999). Die schon seit ein paar Jahren laufenden klinischen Studien zur Tumor-Behandlungen mit CD152 blockierenden Antikörpern sind vielversprechend, zeigen jedoch einige Nebenwirkungen (Phan et al., 2003). Bei klinischen Studien mit den humanen anti-CD152 Antikörpern MDX-010 und CP-675,206 traten starke Begleiterscheinungen auf, die sich in der Senkung des Aktivierungsschwellenwertes von T Zellen in autoimmunen Reaktionen gegen verschiedenste Organe äußerten (Attia et al., 2005; Hodi et al., 2003; Maker et al., 2005). Besonders Hautexanteme

und Entzündungen des Gastrointestinaltrakts traten in vielen Fällen auf, es wurden aber auch ernste Fälle von Augenentzündungen und Hepatitis beobachtet (Egen et al., 2002; Hodi et al., 2003; Leach et al., 1996). Abgesehen von solchen Nebenwirkungen zeigt die Blockade von CD152 bei der Tumor-Therapie aber eine effektive immunstimulierende Wirkung, welche durch simultane Impfungen in gewissem Maße sogar verstärkt und gezielt auf bestimmte Antigene gerichtet werden kann. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass durch eine gleichzeitige Impfung des Patienten mit einer verwandten GM-CSF (engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) produzierenden Tumor-Zelllinie, die durch die CD152 Blockade bereits verstärkte Immunantwort zusätzlich angehoben und die Tumornekrose in vivo signifikant verstärkt werden konnte (van Elsas A. et al., 2001; van Elsas A. et al., 1999; Hurwitz et al., 1998). Auch die Kombination der CD152-Blockade mit anderen bereits bewährten Behandlungsvarianten, wie z.B. Chemotherapie und Strahlentherapie, könnten erfolgversprechend sein, da diese Therapien durch die Senkung des Aktivierungsschwellenwertes des Immunsystems mittels CD152-Blockade ergänzt werden könnten (Salomon and Bluestone, 2001).

Der Mechanismus, dessen sich CD152 bedient, um die zytotoxische Immunabwehr von CD8<sup>+</sup> T Zellen zu verstärken, ist bis heute ungeklärt. Erstaunlicher Weise konnten bisher keine direkten Effekte von CD152 Signalen auf eine Abschwächung der Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T Zellen nachgewiesen werden (Bachmann et al., 1998; Bachmann et al., 2001). Lediglich eine generelle Verstärkung der anti-Tumor Immunität nach CD152-Blockade durch Einsatz eines anti-CD152 Antikörpers konnte gezeigt werden (van Elsas A. et al., 1999; van Elsas A. et al., 2001). Diese war allerdings nur auf eine erhöhte Anzahl an Effektorzellen zurückzuführen. Eine Zunahme der Zytotoxizität individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Da bei einer Kombinationstherapie von anti-CD152 mit einer simultanen Impfung gegen ein B16-Melanom-Antigen in vielen Fällen eine Depigmentierung von solchen Organen auftrat, die Melanin-verwandte Antigene exprimieren, dies aber bei der Monotherapie mit einer Impfung allein nicht vorkam, scheint eine CD152-Blockade fähig zu sein, die periphere Immuntoleranz aufzuheben (Sutmuller et al., 2001; Attia et al., 2005; Demaria et al., 2005). Zu erwähnen ist auch, dass die Depigmentierung bei der Monotherapie mit anti-CD152 nicht zu beobachten war, was darauf hinweist, dass die Blockade von CD152 allein nicht ausreicht, die periphere T-Zell-Toleranz in vergleichbarem Maß zu senken. Auch der Einfluss der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Hilfe bei der Steuerung von zytotoxischen Immunantworten ist umstritten (Demaria et al., 2005; Attia et al., 2005). Obwohl die Beteiligung von CD4<sup>+</sup> T



Zellen für eine zytotoxische Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T Zellen in manchen Studien nicht nötig war (Demaria et al., 2005), gibt es doch Hinweise, dass die Therapie mit CD152-blockierenden Antikörpern den Prozentsatz an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen senkt und so zumindest einen Teil der immunmodulierenden Effekte vermittelt (Attia et al., 2005). Die in der hier vorliegenden Arbeit genauere experimentelle Untersuchung der Mechanismen, derer sich CD152 bedient, um die Immunantworten von CD8<sup>+</sup> T Zellen zu beeinflussen, soll einen Beitrag dazu leisten, den Einsatz solcher therapeutischen Verfahren besser zu verstehen und kontrollieren zu können.

## **1.6 Transkriptionelle Regulation der Effektormolekül-Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen**

Wie CD152 Signale Einfluss auf die Regulation proinflammatorischer Zytokine von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten auf transkriptioneller Ebene nehmen, ist weitgehend unbekannt. In den vergangenen Jahren haben sich die Hinweise verdichtet, dass die Entwicklung funktionell verschiedener CD8<sup>+</sup> T Zell-Linien vorwiegend durch zwei zentrale Transkriptionsfaktoren reguliert werden, nämlich T-bet und Eomesodermin (Eomes) (Glimcher et al., 2004; Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2003; Townsend et al., 2004). Wie Sequenzanalysen ergaben, sind T-bet und Eomes beide der Familie der T-box Transkriptionsfaktoren zugehörig. Zudem zeigte die Untersuchung der Aminosäurenabfolge eine große Homologie von Eomes und T-bet, die auch durch eine 74% identische T-box Region verdeutlicht wird (Pearce et al., 2003). Für lange Zeit galt T-bet als der Hauptregulator für die Differenzierung vieler Effektor-Zellen des Immunsystems. So korreliert die Expression von T-bet beispielsweise mit der Entwicklung von Effektor NK-, CD8<sup>+</sup>-T- und CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen. Zusätzlich wurde in Experimenten, bei denen T-bet genetisch inaktiviert wurde, eine Senkung der IFN- $\gamma$  Produktion in diesen Zellen nachgewiesen (Mullen et al., 2001; Szabo et al., 2000; Szabo et al., 2002).

Die Funktion von Eomes wurde ursprünglich bei der Steuerung der mesodermalen Zelldifferenzierung in Wirbeltieren entdeckt (Ryan et al., 1996). Zusätzlich, wurde auch ein Einfluss auf die Differenzierung von Säuger-Trophoblasten nachgewiesen (Russ et al., 2000). Da die homozygote genetische Inaktivierung von Eomes zu einem frühem Tod in der embryonalen Entwicklung führt, wurde dessen Funktion erst durch den Einsatz retroviraler Transduktionsexperimente und heterozygoter genetischer Deletion offensichtlich. Wie T-bet

wird auch Eomes in aktivierten NK- und CD8<sup>+</sup>- T Zellen signifikant induziert und hat einen förderlichen Einfluss auf die zytotoxischen Mechanismen dieser Zellen durch die Hochregulation der Granzym-, Perforin- und IFN- $\gamma$ -Gen-Transkription (Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2003). Experimente mit homo- und heterozygoten Mutationen des Eomes- und T-bet-Gens in Mäusen unterstützen die Sichtweise, dass diese Transkriptionsfaktoren partiell redundant die Effektor-Gen-Expression zytotoxischer T Zell Linien regulieren (Intlekofer et al., 2005). Allerdings scheint Eomes bei der Induktion von Effektor-Molekülen in T Zellen einen größeren Einfluss zu haben als T-bet, wie durch retrovirale Gen-Überexpressions-Analysen in T<sub>h</sub>2 Zellen gezeigt werden konnte (Pearce et al., 2003). Eomes und T-bet sind beide unabhängig voneinander in der Lage, die Produktion von Perforin und Granzym-B mRNA, bzw. Protein, in sich entwickelnden T<sub>h</sub>2 Zellen zu induzieren. Eomes zeigte bei diesen Experimenten allerdings eine deutlich größere Effizienz. Hinzu kommt, dass in CD8<sup>+</sup> T Zellen, bei denen lediglich T-bet, nicht aber Eomes ausgeschaltet wurde, keine Beeinträchtigung zytotoxischer Funktionen und eine normale IFN- $\gamma$  Produktion zu beobachten war (Szabo et al., 2002). Zusammengenommen implizieren diese Ergebnisse die Existenz eines T-bet unabhängigen Signalwegs, der die Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Effektor-Zellen durch Nutzung des Transkriptionsfaktors Eomes steuert.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

---

Die effektive Beseitigung intrazellulärer Pathogene und Viren hängt entscheidend von der einwandfreien Funktionsweise der zellvermittelten Immunität ab. Die Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten repräsentieren hierbei einen wichtigen Teil des adaptiven Immunsystems in höheren Vertebraten. Durch die Interaktion des TZR auf CD8<sup>+</sup> T Zellen mit intrazellulären Peptiden, die MHC-I restringiert auf kernhaltigen somatischen Zellen präsentiert werden, wird sichergestellt, dass auch Pathogene, die sich im Zytosol körpereigener Zellen vor der extrazellulären Immunabwehr verbergen, erkannt und beseitigt werden können. Bei einer Fehlregulation dieses Systems besteht aber auch die Gefahr autoimmuner Reaktionen, d.h. solcher, die gegen gesundes Gewebe gerichtet sind.

Großen Einfluss auf das Ergebnis der gesamten Immunantwort nehmen zudem auch direkte und indirekte Effekte, die durch die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten auf andere Zellen des Immunsystems induziert werden. Hierbei spielen kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD28, CD152, PD-1, BTLA-4, u.a., die auf der Oberfläche der T Zellen exprimiert werden, eine wichtige regulatorische Rolle. CD152 als einem zentralen inhibitorischen Rezeptor kommt unter diesen eine besondere Bedeutung bei der Steuerung von Effektorfunktionen aktivierter CD8<sup>+</sup> T Zellen zu. Wie CD152 durch die Bindung seiner Liganden CD80 und CD86 die Aktivierung der T Zellen hemmt, ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Speziell die Hemmung der Zytokin-Produktion und eine eventuell unterschätzte Beeinflussung der Zytotoxizität individueller CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten durch transkriptionell regulatorische Mechanismen ist weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren sind die Mechanismen der Gen-Regulation für die Effektor-Zell-Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen genauer erforscht worden und haben die zentrale Rolle zweier T-box Transkriptionsfaktoren, T-bet und Eomesodermin (Eomes), in den Vordergrund gerückt. In Anbetracht dieser neuen Erkenntnisse, speziell der dominanten Beteiligung des Transkriptionsfaktors Eomes, wurde die Fragestellung der hier vorgelegten Arbeit definiert.

Ziel war es, die Wirkung des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD152 auf Immunantworten von CD8<sup>+</sup> T Zellen in vitro und in vivo experimentell zu untersuchen und insbesondere zu klären, über welchen molekularen Mechanismus CD152-Signale die Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T Zellen hemmen. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse

---

sollen neue Ansatzpunkte für die gezielte Einflussnahme auf die regulatorischen Mechanismen der Immunreaktionen liefern, um so die Möglichkeiten von Immuntherapien zu erweitern.

## 3 Material und Methoden

---

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

AutoMACS™	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Blockthermostat, BT-100™	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
ELISA-Reader, Fluoroscan Ascent™	Thermo Labsystems, USA
FACS Analyzer, Calibur™	BD Biosciences, USA
FACS Sorter, Aria™	BD Biosciences, USA
FACS Sorter, DiVa™	BD Biosciences, USA
Hybridisierungsöfen, 6/12V™	UniEquip, Martinsried
Inkubator, Hera cell™	Heraeus, Hanau
Mikroskop, Wilovert-S™	Hund, Wetzlar
pH-Meter, 766™	Knick, Berlin
Pipetten, Pipetman™	Gilson Inc., USA
SDS-PAGE, Mini-Protean3™	Bio-Rad Laboratories, München
Spannungsquelle, Power Pack 25™	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer, ND-1000™	NanoDrop Technologies, USA
Sterilbank, Hera safe™	Heraeus, Hanau
Thermocycler, TRIO™	Biometra, Göttingen
Tiefkühler (-80°C), Hera freeze™	Heraeus, Hanau
UV-Tisch, GeneGenius™	Syngene, Cambridge
Waage, R 300 S™	Sartorius research, Göttingen
Zentrifuge, Biofuge fresco™	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1.0R™	Heraeus, Hanau

#### 3.1.2 Kunststoffartikel und Zellkulturmaterialien

Die aufgeführten Materialien stammen, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen: Braun (Melsungen), Costar (Bodenheim), Dynatech (GB), Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Frickhausen).

1,5 ml Reaktionsgefäße, 0,5 ml Reaktionsgefäße, 0,5 ml Thermo-Reaktionsgefäße für PCR, 15 ml PP-Röhrchen, 50 ml PP-Röhrchen, Zellkulturplatten, Petrischalen in verschiedenen Größen, 96er ELISA Platten: EIA/RIA (Flachboden), 0,2 µM Zell-Filter (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach), Spritzen (verschiedene Größen), Filterspitzen (verschiedene Größen), 70 µm Zellsiebe (BD Biosciences, USA).

### 3.1.3 Puffer und Medien

Sämtliche verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Für das Ansetzen der Lösungen wurde membranfiltriertes Milipore™ (Schwalbach) Wasser verwendet.

PBS:	8 g/l NaCl + 0,2 g/l KCl + 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS/BSA:	PBS + 2 g/l Rinderserumalbumin (BSA)
PBS/BSA/AZID:	PBS/BSA + 0,05% NaN <sub>3</sub>
Fixierlösung:	2% Paraformaldehyd in PBS
Permeabilisierungspuffer:	0,5% Saponin in PBS/BSA
Erythrozyten-Lyse-Puffer:	10 mM KHCO <sub>3</sub> + 155 mM NH <sub>4</sub> Cl + 0,1 mM EDTA (pH 7,5)
RPMI 1640:	RPMI (PAA, Pasching, Österreich) + 10% FKS (fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert) (Sigma-Aldrich, Steinheim) + 100 U/ml Penicillin (PAA, Pasching, Österreich) + 100 U/ml Streptomycin (PAA, Pasching, Österreich) + Glutamax-I (0,3 mg/ml Glutamin) + 10 µg/ml 2-Mercaptoethanol
DMEM:	DMEM (PAA, Pasching, Österreich) + 10% FKS + 100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin + Glutamax-I (0,3 mg/ml Glutamin) + 10 µg/ml 2-Mercaptoethanol + 10 nM Natrium-Pyruvat (Biochrom, Berlin)
TAE:	0,04 M Tris-Azetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
TBS:	20 mM Tris + 137 mM NaCl + 3,8 ml/l HCl (1M), pH 7,6
TBS-T:	TBS + 0,1% Tween-20

2xHBS: 50 mM HEPES pH 7,05 + 10 mM KCl + 12 mM Dextrose +  
280 mM NaCl + 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 3.1.4 Mäuse

Es wurden Mäuse des Stammes C57Bl/6, CD45.1, sowie Mäuse, die transgen für die  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors sind, verwendet (OT1 und P14). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen der transgenen OT1 Mäuse erkennen ausschließlich ein acht Aminosäuren langes Peptid (OVA<sub>257-264</sub>) aus dem Ovalbumin Protein des Huhns. Die CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten der P14 Mäuse erkennen mit ihrem transgenen TZR ausschließlich das Peptid GP33 welches aus dem Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) stammt. Außerdem kamen CD152<sup>-/-</sup> x OT1 und CD152<sup>+/+</sup> x OT1 Mäuse zum Einsatz. Diese wurden durch Kreuzung aus den Ursprungsstämmen gezüchtet. Nachkommen der CD152<sup>-/-</sup> x OT1 Mäuse wurden mittels PCR unter der Verwendung folgender Oligonukleotid-Primer genotypisiert: CD152: 5' TGG AGT CCT TCA TAG TTA GG und 5' AAC ATCACA CTC ACC ATC TTG C; Neo: 5' CAT AGT TAG GTC TGT GAT GC und 5' GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC G. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden mindestens für zehn Generationen auf den C57Bl/6 Stamm zurück gekreuzt. Alle Stämme wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin gehalten und in einem Alter von 5-12 Wochen verwendet. Die Versuche wurden entsprechend dem Alter und Geschlecht der Tiere angepasst durchgeführt und stimmten mit den staatlichen und institutionellen Richtlinien überein. Die Tierversuchsgenehmigungs-Nummern lauten: T0098/00 und G0226/01.

### 3.1.5 Antikörper und Chemikalien

Folgende Antikörper gegen Antigene der Maus wurden verwendet: Anti-CD3 (145-2C11, DRFZ), anti-CD8 (196, DRFZ), anti-CD44 (IM7, DRFZ), anti-CD62L (MEL14, DRFZ), anti-IFN- $\gamma$  (AN18.17.24, DRFZ), anti-CD152 (UC10-4F10-11, DRFZ), anti-DEC205 (NLDC-145, DRFZ), anti-CD40 (1C10, DRFZ) anti-V $\alpha$ 2-TCR (B20.1, BD Biosciences), anti-CD45.2 (104, BD Biosciences), anti-GranzymeB-PE (GB12, Caltag), anti- $\alpha$ -Tubulin (DM1A, Calbiochem), anti-Eomesodermin (ab31717, Abcam), anti-rabbit-IgG (Abcam), anti-T-bet (4B10, Santa Cruz), anti-murine-IgG (BD Biosciences). PE konjugierte Kb-OVA<sub>257-264</sub>-Tetramere wurden von Orpegen Pharma (Heidelberg) bezogen. CFSE (5,6-

Carboxyfluorescein Diazetat Succinimidyl Ester; Molecular Probes) wurde für die Färbung der Zielzellen des Zytotoxizitäts-Tests und die Ko-Kultur Versuche verwendet. Murines IL-2 wurde aus Überständen der Maus-Zell-Linie X63-IL-2.6 verwendet. Die Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt (siehe Kapitel 3.2.6).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting oder kurz: FACS) erlaubt es, Zellen, die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern oder mit anderen fluoreszierenden Stoffen markiert wurden, auf Einzelzellebene nachzuweisen oder aber auch zu sortieren. Hierfür werden die markierten Zellen in einem hydrodynamischen Flüssigkeitsstrom vereinzelt und nacheinander mit Laserlicht bestrahlt. Bei dem hier verwendeten FACS-Gerät (Calibur) der Firma BD Biosciences wird der Flüssigkeitsstrom mit einem Argon Laser (488nm) und einem Diodenlaser (635nm) durchleuchtet. Hierdurch werden zum einen die Fluoreszenz-Farbstoffe angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, die für den verwendeten Farbstoff spezifisch ist, zum anderen, wird das auftreffende Laser-Licht durch die Zellen gestreut. Das in einem geringen Winkel von 3°-10° gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet, das um 90° reflektierte Licht wird Seitwärtsstreulicht (SSC) genannt. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird gleichzeitig von vier Fotodetektoren gemessen, die hinter sogenannten „Band-Pass-Filtern“ installiert sind, wodurch jeder der Fotodetektoren nur Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs misst (siehe auch Kapitel 8 Abkürzungen). Für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe galten folgende Wellenlängenbereiche, die auch als Mess-"Kanäle" bezeichnet werden:

Kanal (Wellenlängenbereich)	Fluoreszenzfarbstoffe
FL-1 (530/30 nm)	FITC / CFSE / GFP
FL-2 (585/42 nm)	PE
FL-3 (670/LP nm)	PI / PerCp / PE-Cy5
FL-4 (661/16 nm)	Cy5 / APC



Bei dem in dieser Arbeit verwendeten FACS-Calibur (BD Biosciences) wurden FSC- und SSC-Signale in linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Tote Zellen wurden bei Oberflächenfärbungen durch Färbung mit PI ausgeschlossen. Es wurden in der Regel 20.000 bis 100.000 lebende Zellen aufgenommen. Bei der Färbung fixierter Zellen wurden durchschnittlich 100.000 Lymphozyten aufgezeichnet.

### **3.2.2 Markierung von Oberflächenantigenen**

Das Färben der Oberflächenantigene wurde bei einer zuvor titrierten Konzentration des jeweiligen Antikörpers und einer Zellkonzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml für 15 min auf Eis durchgeführt. Die Färbungen erfolgten in einem Volumen von 50-100  $\mu$ l PBS/BSA und wurden durch das Waschen mit einer Zugabe des 10-fachen Volumens PBS/BSA gestoppt. Für die fluoreszenz-zytometrische FACS-Messung wurden sie in 400  $\mu$ l PBS/BSA resuspendiert. Nicht antigenspezifische Bindungen über konstante Regionen der Antikörper an Fc $\gamma$ -Rezeptoren der zu färbenden Zellen wurden durch vorherige Inkubation mit einem anti-Fc $\gamma$ -Antikörper verhindert.

### **3.2.3 Markierung von intrazellulären Antigenen**

Für die Färbung intrazellulärer Antigene wurden die zuvor oberflächenmarkierten Zellen bei einer Zellkonzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in der Fixierlösung für 20 min auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen in dem 10-fachen Volumen PBS/BSA gewaschen. Die Färbung der intrazellulären Antigene der nun fixierten Zellen wurde durch Inkubation in Permeabilisierung-Puffer zusammen mit dem spezifischen Antikörper bei einer Zellkonzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml für 20 min auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in einem 10-fachen Volumen Permeabilisierungs-Puffer gewaschen und für die fluoreszenz-zytometrische FACS-Messung in 400  $\mu$ l PBS/BSA resuspendiert. Auch bei intrazellulären Färbungen wurde eine nicht antigenspezifische Bindung der Antikörper über ihre konstante Region an Fc $\gamma$ -Rezeptoren der zu färbenden Zellen durch vorherige Inkubation mit einem anti-Fc $\gamma$ -Antikörper verhindert.

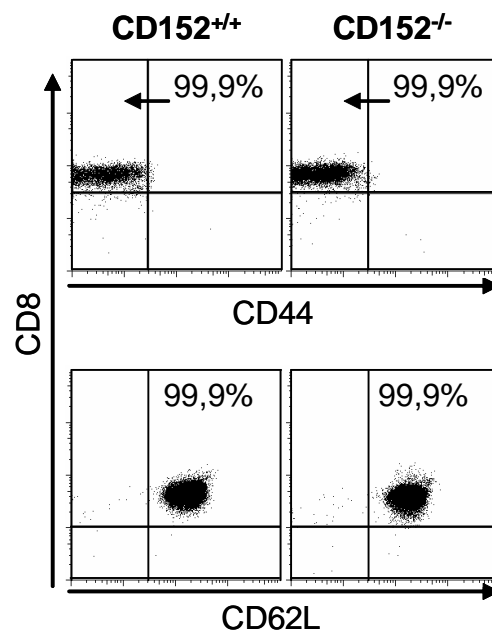
### **3.2.4 Zytometrische Detektion phosphorylierter MAP-Kinase ERK**

Die intrazelluläre Detektion der phosphorylierten Variante der MAP-Kinase ERK wurde nach antigenspezifischer Restimulation der CD8<sup>+</sup> T Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor

oberflächenmarkierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bei einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in der Fixierlösung für 20 min auf Eis fixiert und für 30 min auf Eis mit 100% Methanol permeabilisiert. Die Färbung wurde anschließend mit einem PE gekoppeltem anti-Phosph-ERK1/2 Antikörper-Konjugat der Firma BD Biosciences in PBS/BSA bei Raumtemperatur nach Herstellerangabe durchgeführt.

### 3.2.5 Anreicherung und Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten

Für die Isolierung muriner CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten des naiven Phänotyps (CD44<sup>low</sup>, CD62L<sup>high</sup>) wurden den Mäusen nach Tötung durch zervikale Dislokation zunächst die Milzen und die peripheren (inguinalen und axillären) Lymphknoten entnommen. Die Erythrozyten der Einzelzellsuspension der Organe wurden dann durch Inkubation mit dem Erythrozyten-Lyse-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Zellen nach Herstellerangaben mit anti-CD8 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) 30 min bei 4°C inkubiert. Diese mit anti-CD8 Antikörper konjugierten paramagnetischen Microbeads ermöglichen eine magnetische



**Abbildung 6:** Durchflusszytometrische Überprüfung der Anreicherung naive sortierter CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen nach der FACS Anreicherung. Milzen und periphere Lymphknoten wurden aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> Mäusen präpariert und daraus die T-Lymphozyten und mittels MACS<sup>TM</sup> auf CD8<sup>+</sup> Expression vorsortiert. Danach wurde die positive Fraktion mittels FACS auf einen CD44<sup>low</sup> und CD62L<sup>high</sup> Phänotyp hin angereichert. Die Abbildung zeigt alle lebenden (PI-negativen) Zellen nach der durchflusszytometrischen Anreicherung. Die angegebenen Prozente geben die Häufigkeit der Zellen in den jeweiligen Quadranten bezogen auf die Gesamtzellzahl an. Dargestellt ist eines von 25 unabhängigen Experimenten.

Zellsortierung (MACS) (Miltenyi et al., 1990). Nach der Anreicherung der CD8<sup>+</sup> Zellen wurde die Zellsuspension auf Eis für 15 min mit FITC-konjugierten anti-CD8 und Cy5-konjugierten anti-CD44 Antikörpern inkubiert. Durch die darauf folgende Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) konnten die CD8<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup> exprimierenden T Lymphozyten reproduzierbar auf eine Reinheit von >99% angereichert werden (**Abbildung 6**). Für die FACS-Sortierung kamen die Geräte DiVa<sup>TM</sup> und Aria<sup>TM</sup> (BD Biosciences) zur Anwendung. Für die Antigen-spezifische Aktivierung der so gewonnenen naiven T Zellen wurden außerdem T Zell depletierte Antigen präsentierende Zellen (APZ) benötigt. Diese wurden aus Milzen von C57Bl/6 Mäusen gewonnen. Hierfür wurden die CD90 exprimierenden Zellen der Milzzellsuspensionen nach der Erythrozyten-Lyse durch Depletion mittels anti-CD90-Microbeads (Milteniy Biotech, Bergisch Gladbach) und MACS entfernt. Die auf diese Weise auf >95% angereicherten APZ wurden dann im Verhältnis 1:6 (T-Zellen:APZ) für die Stimulation der in vitro Kulturen in RPMI-1640 Medium (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) eingesetzt. Durch Zugabe des Peptids OVA<sub>257-264</sub> (P. Henklein, Biochemisches Institut der Charité, Berlin) in einer Konzentration von 1 µg/ml wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert. An Tag drei nach der initialen Stimulation wurden die Kulturen, wenn nicht anders angegeben, mit 50 U/ml IL-2, das aus dem Überstand der Maus Zelllinie X63-IL-2.6 gewonnen wurde, und frischem Medium im Verhältnis 1:2 gefüttert. Nach der Abtrennung toter Zellen durch eine Gradientenzentrifugation mit Histopaque-1083 (Sigma) an Tag 8, wurden die lebenden CD8<sup>+</sup> T Zellen mit frischen APZ und neuem Medium durch Zugabe von 1 µg/ml OVA<sub>257-264</sub> Peptid antigenspezifisch restimuliert.

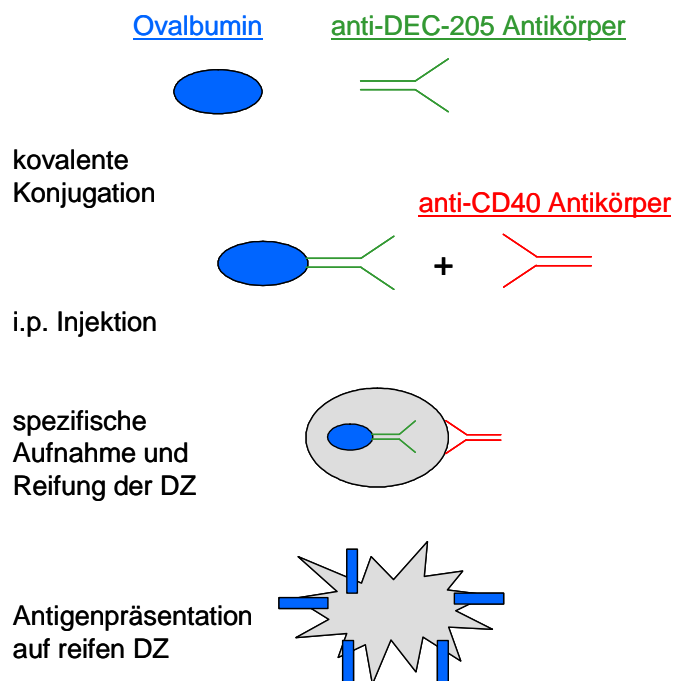
Die antigenspezifische Primärstimulation in vivo wurde 24 h nach i.v.-Injektion von 1x10<sup>6</sup> naiv sortierten CD8<sup>+</sup> T Zellen in kongene CD45.1 oder C57Bl/6 Empfängertiere durchgeführt. Die Stimulation erfolgte durch i.p. Immunisierung unter Verwendung des anti-DEC-OVA Konjugats (5 µg/Maus) und von anti-CD40 Antikörpern (50 µg/Maus).

### 3.2.6 IFN-γ Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Überstände der Zellkulturen entnommen, bei -80°C eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Die Konzentrationen von IFN-γ darin wurden durch Verwendung eines ELISA (engl.: enzyme linked immunosorbent assay) mit einem Kit von R&D Systems (Minneapolis, USA) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

### 3.2.7 In vivo Experimente

Für die antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T Zell Stimulation in vivo wurde den kongenen Empfänger-Mäusen ein Gemisch aus anti-DEC-OVA (5 µg/Maus) und anti-CD40 (50 µg/Maus) Antikörpern i.p. injiziert (**Abbildung 7**). Anti-DEC205-OVA Konjugate wurden wie folgt hergestellt: LPS freies Ovalbumin (Sigma) wurde mittels Succinimidyl-4-(N-Maleimido-Methyl)-Zyklohexan-1-Carboxylat (Sulfo-SMCC; Pierce) nach Herstellerangaben aktiviert. Freies Sulfo-SMCC wurde nach der Aktivierung durch Verwendung einer PD10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) entfernt. Die Disulfidbrücken der anti-DEC-205 Antikörper wurden mit 12 mM DTT (Sigma) für 1 h bei Raumtemperatur reduziert. Freies Reduktionsmittel wurde darauf folgend mit einer PD10 Gelfiltrationssäule abgetrennt. Das aktivierte Ovalbumin wurde dann über Nacht bei 4°C kovalent an die reduzierten anti-DEC-205 Antikörper gebunden. Anschließend wurde unkonjugiertes Ovalbumin durch die Verwendung einer Protein G Säule (Amersham) aus dem Gemisch abgetrennt. Durch

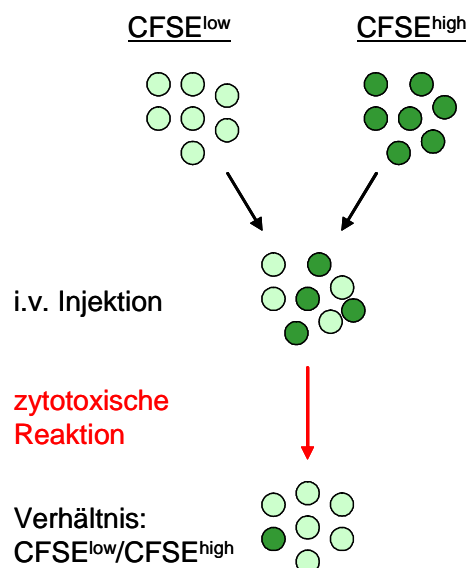


**Abbildung 7:** Illustration der Herstellung von anti-DEC-OVA und der Wirkungsweise der Immunisierungsmethode von Mäusen mittels simultaner Administration von anti-CD40 Antikörpern. Nach der kovalenten Bindung des anti-DEC-205 Antikörpers (grün) an das Ovalbumin (blau) folgte die gleichzeitige i.p. Injektion des entstandenen anti-DEC-OVA-Komplexes zusammen mit anti-CD40 Antikörpern (rot). Durch die Kopplung des anti-DEC-205 Antikörpers erfolgt in vivo eine spezifische Aufnahme des Ovalbumins durch unreife DZ, die aufgrund der Anwesenheit des anti-CD40 Antikörpers aktiviert werden und reifen. Dies führt dann zu einer effektiven T Zell-Stimulation durch die Antigenpräsentation der reifen DZ.

Spektralphotometrie und SDS-PAGE wurden jene Fraktionen identifiziert, die die Konjugate enthielten. Die Abtrennung multivalenter Konjugate, bei denen sich mehrere Ovalbumin Moleküle verbunden hatten, wurde durch den Einsatz einer FPLC Gelfiltrationssäule Hiload 16/60 Superdex 200 (Amersham) bewerkstelligt. Nur Fraktionen, die monovalente anti-DEC205-OVA Konjugate enthielten, überprüft durch die Verwendung der SDS-PAGE, wurden vereint, sterilfiltriert und gegen PBS dialysiert. Die anti-CD40 Antikörper für die Verwendung bei den Immunisierungen wurden ebenfalls gegen PBS dialysiert.

### 3.2.8 In vivo Zytotoxizitäts-Test

In vivo Zytotoxizitäts-Tests wurden im Prinzip wie beschrieben durchgeführt (Hernandez et al., 2001). Komplette Milzzellen wurden nach der Erythrozyten-Lyse in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine der Fraktionen wurde dann 1 h lang mit 1 µg/ml OVA<sub>257-264</sub> Peptid in RPMI-1640 Medium, die andere nur in RPMI-1640 Medium ohne Peptid bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Peptid beladene Fraktion wurde mit einer hohen CFSE-Konzentration (CFSE<sup>high</sup> / 1:600), die unbeladene mit einer geringen CFSE-Konzentration (CFSE<sup>low</sup> / 1:10000) für 5 min auf Eis in PBS inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von RPMI-1640-Medium mit 10% FKS gestoppt, die



**Abbildung 8:** Illustration des in vivo Zytotoxizitäts-Tests. Alle Milzzellen derselben Präparation wurden in 2 getrennten Ansätzen unterschiedlich stark mit dem Zellfarbstoff CFSE gefärbt. Die stark gefärbten ( $CFSE^{high}$ ) wurden mit Antigen beladen, die schwach gefärbten ( $CFSE^{low}$ ) nicht. Anschließend wurde das Gemisch i.v. in die zu untersuchenden Empfängertiere injiziert. Die spezifische Lyse der Zellpopulationen wird nach wenigen Stunden mittels durchflusszytometrischer Analyse des Verhältnisses von  $CFSE^{low}$  zu  $CFSE^{high}$  Zellen ermittelt.

Fractionen wurden gewaschen und 1:1 wiedervereinigt. Nach der i.v. Injektion dieses Gemischs ( $6 \times 10^6$  Zellen/Maus) aus OVA<sub>257-264</sub> Peptid beladenen (CFSE<sup>high</sup>) und Peptid unbeladenen (CFSE<sup>low</sup>) Milzzellen, wurden 3-16 h später die Empfängertiere geopfert und die spezifische Lyse durch Verwendung der Formel „ $[1 - \text{Verhältnis (CFSE}^{\text{high}}/\text{CFSE}^{\text{low}})] \times 100$ “ quantifiziert (**Abbildung 8**).

### 3.2.9 Retrovirale Transduktion primär stimulierter T-Lymphozyten

Für die Herstellung der Viren wurde die 293T Zell-Linie verwendet. Solche Zellen wurden transient durch Kalzium-Phosphat Präzipitation mit dem retroviralen Expressionsplasmid zusammen mit den Vektoren für die Verpackungsgene pCGP und pECO (Prof. Kenneth Murphy, Washington University, St. Luis, USA) transfiziert. Es wurden  $5 \times 10^6$  293T Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale (Greiner Bio-one, Solingen) ausgesät. 10 µg pCGP, 10 µg pECO und 20 µg des retroviralen Expressionsplasmids wurden in 1,5 ml H<sub>2</sub>O und 400 µl 1,25 M CaCl<sub>2</sub> vorgelegt. Anschließend wurde die Lösung, während ständiger Durchmischung mittels Luftblasen, tropfenweise mit 2 ml 2xHBS-Puffer versetzt. Die Lösung wurde auf eine 10 cm Petrischale einer 293T Zellkultur gegeben und 4 h im Inkubator belassen. Danach wurde das Medium erneuert und die Zellkultur verblieb weitere 36 h im Inkubator. Hierauf folgend, wurde der Virusüberstand abgenommen, durch ein 0,2 µm Membranfilter (Sarstedt, Nümbrecht) sterilfiltriert und mit 10 mM Polybrene (Sigma) und 100 mM HEPES (Sigma) angereichert. Währenddessen, genauer 16 h nach Beginn der Transfektion der 293T Zellen, wurde wie oben beschrieben, eine zu transduzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellkultur Antigen spezifisch stimuliert. 24 h nach Beginn der T-Zell Stimulation wurde dann das konditionierte Medium der Kultur vorsichtig abgenommen und durch den Virusüberstand der 293T Zell-Kultur ersetzt. Die so behandelte T-Zell-Kultur wurde darauf folgend bei 677 G und 37°C 90 min lang zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der virale Überstand gegen das auf 37°C vorgewärmte, konditionierte Medium der ursprünglichen T-Zell-Kultur ausgetauscht.

### 3.2.10 Gelelektrophorese und Western Blot

$1 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen, mittels FACS Sortierung zu >99% angereichert, wurden nach Restimulation in 100 µl Lyse-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert. Der Lyse-Puffer enthielt: 20 mM Tris, 0.5% Nonidet P-40, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM β-Glycerophosphat, 0.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM DTT und 0.1 mM PMSF. Der Proteingehalt der zu vergleichenden Lysate wurde durch Justierung der Zellzahlen und Kontrolle durch einen

BSA-Protein-Assay (Pierce, Rockford, USA) angeglichen. 30 µl des Lysats wurden auf einem 12,5%igen Polyacrylamidgel (BioRad, München) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 85, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Unspezifische Bindung von Proteinen an die Membran wurde durch Inkubation der Membran in 5% Magermilchpulver in 1xTBS-T verhindert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primär-Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Maus Ig Antikörper eingesetzt, der für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran mit dem ECL Substrat inkubiert, auf einen Chemolumineszenz Film (GE Healthcare) aufgelegt und entwickelt.

### 3.2.11 Reverse Transkription und PCR-Analysen

CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten wurden mittels FACS-Sortierung zu einer Reinheit von  $\geq 99\%$  angereichert. Die gesamte RNA wurde aus den Zellen unter Verwendung des RNeasy<sup>TM</sup> Mini Kits (Qiagen) isoliert. Anschließend wurde die gesamte RNA durch revers transkriptionelle PCR (RT-PCR) unter Verwendung von TaqMan<sup>TM</sup> Reagenzien (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR-Reaktion fand in einem 20 µl Volumen statt, das folgende Komponenten enthielt: 0,5 µg RNA, 1x Multiscribe-buffer<sup>TM</sup>, dNTPs (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (5,5 mM), RNase inhibitor (0,4 U/µl), willkürliche Hexamere und oligo-d(T)<sub>16</sub> (1,25 µM jeweils) und Multiscribe<sup>TM</sup> reverse Transkriptase (1,25 U/µl). Das Reaktionsgemisch wurde zur Anlagerung der Hexamere im Thermocycler für 10 min bei 25°C inkubiert. Danach folgte die cDNA Erststrang-Synthese für 40 min bei 42°C und die Hitzeinaktivierung bei 95°C für 5 min. Die auf diese Weise gewonnene cDNA wurde bis zur Verwendung in der PCR tiefgefroren aufbewahrt (-80°C). Die spezifischen Oligonukleotid-Primer-Sequenzen, die für die PCR Amplifikation verwendet wurden, lauten wie folgt:

β-Aktin (5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C und 5' TAA AAC GCA CAG TAA CAG TCC G), T-bet (5' TCC TGC AGT CTC TCC ACA AGT und 5' CAG CTG AGT GAT CTC TGC GT), Eomesodermin „kurz“ (5' TGA TAG TGT TGC AGT CTC TG und 5' CAA TCT GAT GGG ATG AAT CG) und Eomesodermin „lang“ (5' AAT ACC AAC CGA GGC TGC AC und 5' GGA ATC CGT GGG AGA TGG AG).

### 3.2.12 Statistische Analysen

Für die Bestimmung der mittleren Verteilung der Ereignisse von FACS-Daten wurde wegen der logarithmischen Auftragung der Fluoreszenzstärke statt des arithmetischen- das geometrische Mittel verwendet.

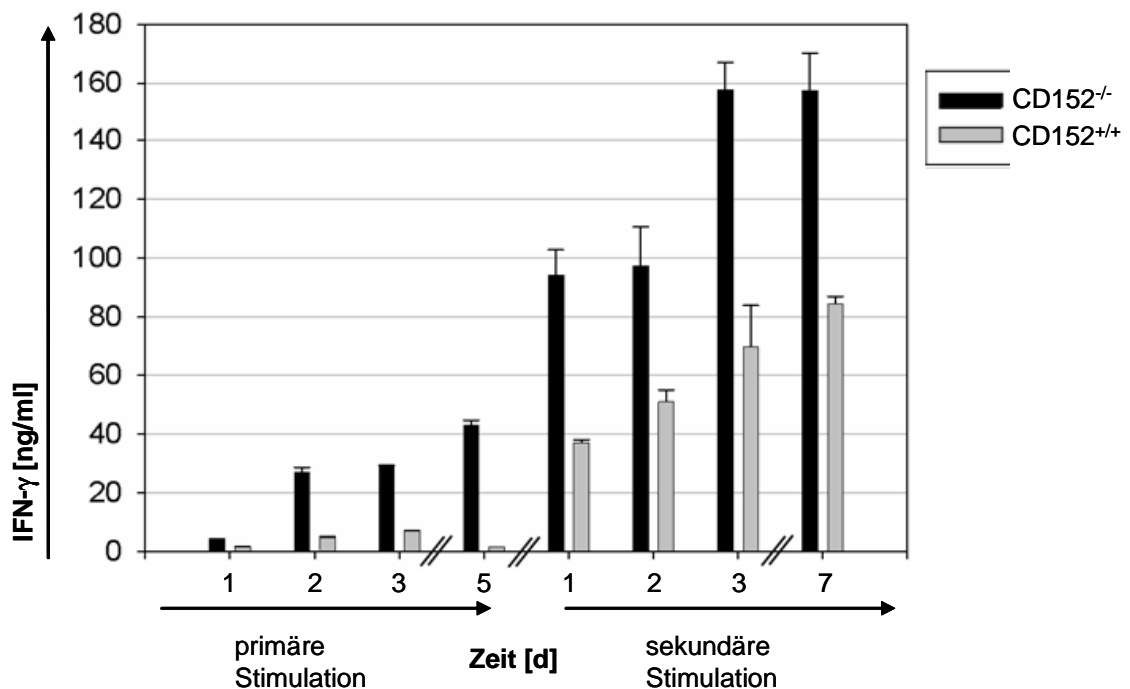
Daten sind als Mittelwert  $\pm$  der einfachen Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Unterschiede wurden ab  $p \leq 0,05$  als signifikant (\*), ab  $p \leq 0,01$  als hoch signifikant (\*\*) definiert.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 CD152 hemmt die IFN- $\gamma$ Sekretion von CD8<sup>+</sup> T Zellen

Nach bisherigem Kenntnisstand wird die Produktion des Schlüssel-Effektor-Zytokins IFN- $\gamma$  während der primären Immunantwort zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T Zellen nicht beeinträchtigt, sondern lediglich nach wiederholtem Antigenkontakt (Chambers et al., 1998). Um zu untersuchen, ob die IFN- $\gamma$  Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen bereits nach antigenspezifischer Stimulation durch CD152 gehemmt wird, wurden die IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Überstand von CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen nach primärer sowie auch nach sekundärer Stimulation der T Zellen mittels eines ELISA-Tests miteinander verglichen (**Abbildung 9**). Naive (CD44<sup>low</sup>, CD62L<sup>high</sup>) CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> OT1-Mäusen, welche einen transgenen TZR mit einer Spezifität für das Peptid OVA<sub>257-264</sub> exprimieren, wurden



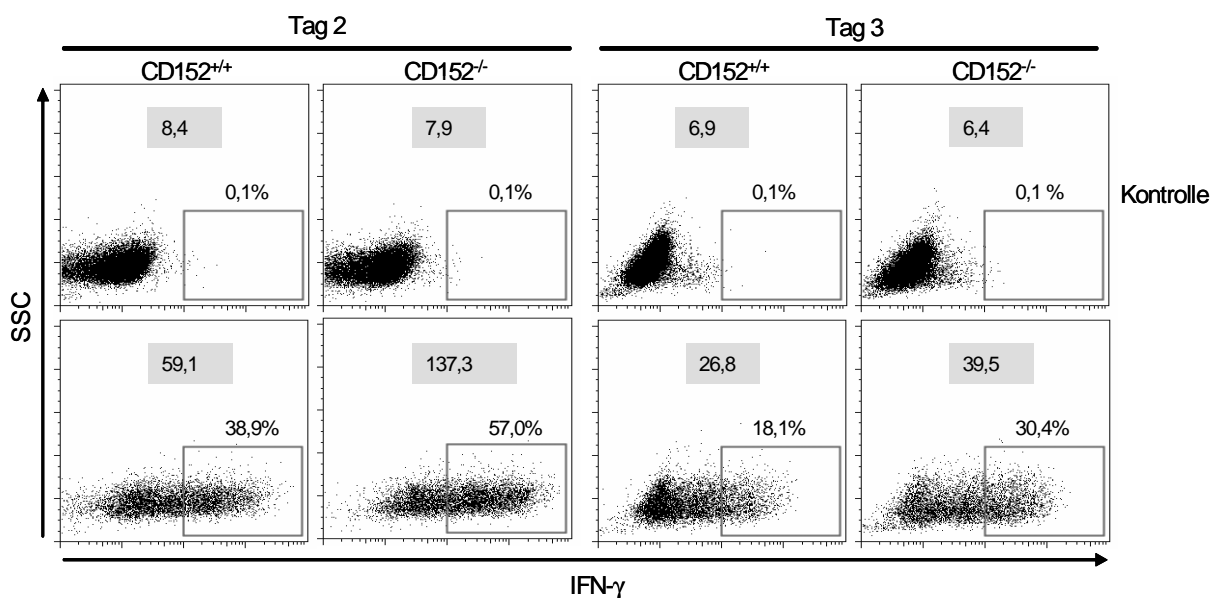
**Abbildung 9:** IFN- $\gamma$  Konzentration (Y-Achse) im Überstand von CD152<sup>+/+</sup> (grau) und CD152<sup>-/-</sup> (schwarz) CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen nach primärer und sekundärer antigenspezifischer Stimulation über der Zeit in Tagen (X-Achse). Tag 1 der sekundären Stimulation entspricht Tag 8 nach der primären. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Konzentrationsbestimmungen auf einer 96-well Mikrotiterplatte im ELISA-Test. Das gezeigte Diagramm repräsentiert einen Versuch aus 4 unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

hierfür antigenspezifisch mit 1 µg/ml OVA<sub>257-264</sub> Peptid im Verhältnis 1:6 mit kongenen T-Zell-depletierten APZ aus C57Bl/6 Mäusen stimuliert. Die sekundäre Stimulation erfolgte an Tag 8 nach Beginn der primären. Dazu wurden alle toten Zellen durch einen Gradienten-Zentrifugationsschritt abgetrennt und die überlebenden CD8<sup>+</sup> T Zellen mit frisch ex vivo isolierten T-Zell-depletierten APZ und 1 µg/ml OVA-Peptid erneut antigenspezifisch stimuliert. Zu allen analysierten Zeitpunkten, sowohl nach primärer als auch nach sekundärer Stimulation, zeigten sich konsistent höhere IFN-γ Konzentrationen in Überständen von CD152 defizienten T Zell Kulturen verglichen mit denen in CD152 kompetenten Kulturen. Die IFN-γ Konzentrationen in Überständen von CD152 kompetenten CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen erreichten während der primären Stimulation ein Maximum von 8 ng/ml an Tag 3 und sanken danach wieder (**Abbildung 9, graue Balken**). CD152 defiziente CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen erreichten dagegen einen Maximalwert von 42 ng/ml an Tag 5 nach initialer Aktivierung (**Abbildung 9, schwarze Balken**). An Tag 7 nach der sekundären Stimulation erreichten CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen 83 ng/ml und CD152<sup>-/-</sup> Kulturen 159 ng/ml (**Abbildung 9**). Die IFN-γ Konzentration in den CD152 defizienten Kulturen war im Vergleich zu den CD152 kompetenten Kulturen zu allen analysierten Zeitpunkten mindestens verdoppelt. Dies gab uns den ersten Hinweis, dass CD152 die IFN-γ Sekretion sowohl bereits nach primärer als auch nach sekundärer Stimulation hemmt.

Da CD152 auch die IL-2 Produktion in T Lymphozyten reguliert und die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T Zellen von IL-2 abhängt (Krummel and Allison, 1995; Walunas et al., 1996), musste geprüft werden, ob eine IL-2 Zugabe die IFN-γ Produktion zusätzlich beeinflusst. Dazu wurden mit 1 µg/ml OVA-Peptid stimulierte CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen entweder mit oder ohne 50 U/ml exogen hinzugefügtes IL-2 auf ihre IFN-γ Sekretion untersucht. Weil CD8<sup>+</sup> T Zellen für eine Stimulation der Proliferation IL-2 erst kurz nach der initialen Effektorphase benötigen, erfolgte die Zugabe von IL-2 stets an Tag 3 nach primärer Aktivierung. Der Vergleich der Experimente mit und ohne IL-2 Zugabe zeigte, dass die CD152 vermittelte Hemmung der IFN-γ Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen durch IL-2 nicht beeinflusst wurde (Daten nicht dargestellt). Das bedeutet, dass CD152 die IFN-γ Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen während der primären und der sekundären Stimulation unabhängig von IL-2 hemmt.

## 4.2 CD152 verringert den Anteil IFN- $\gamma$ produzierender CD8<sup>+</sup> T Zellen nach primärer in vitro Stimulation

Die nachgewiesenen höheren IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Überstand von CD152<sup>-/-</sup> Kulturen hätten auf einer erhöhten Anzahl von CD8<sup>+</sup> T Zellen oder auf einer höheren IFN- $\gamma$  Produktion pro Zelle beruhen können. Zuvor durchgeführte Analysen, in denen die Proliferation und die Apoptose der CD8<sup>+</sup> T Zellen untersucht worden waren, hatten jedoch gezeigt, dass die Zell-Proliferation in beiden Kulturen identisch war (Pandiyana et al., 2007). Da die erhöhten IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Überstand der CD152<sup>-/-</sup> Kulturen nicht auf eine Zunahme der CD8<sup>+</sup> T-Effektor-Zellen und nicht auf eine verstärkte Apoptose zurückzuführen waren, lag es nahe anzunehmen, dass, verglichen mit CD152<sup>-/-</sup> Kulturen, der Prozentsatz solcher CD8<sup>+</sup> Zellen, die hohe Mengen IFN- $\gamma$  produzierten, in CD152<sup>+/+</sup> Kulturen geringer war. Um dies experimentell zu prüfen wurden intrazelluläre IFN- $\gamma$  Mengen auf Einzelzellebene durchflußzytometrisch mittels FACS detektiert.



**Abbildung 10:** CD152 hemmt die IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen. Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung in CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen an Tag 2 und 3 nach primärer antigenspezifischer Stimulation in vitro. Prozente beziehen sich auf die IFN- $\gamma$  produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population. Grau hinterlegte Zahlen beziehen sich auf das geometrische Mittel aller in den Diagrammen dargestellten CD8<sup>+</sup> T Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Versuchen.

Naive TZR transgene  $CD8^+$  T Zellen aus  $CD152^{+/+}$  und  $CD152^{-/-}$  OT1-Mäusen wurden hierfür antigenspezifisch mit  $1 \mu\text{g/ml}$  des  $\text{OVA}_{257-264}$  Peptids und kongenen APZ aus C57Bl/6 Mäusen stimuliert und die intrazelluläre  $\text{IFN-}\gamma$  Produktion individueller Zellen an Tag 2 und Tag 3 zytometrisch bestimmt. Die Daten (**Abbildung 10**) zeigen, dass  $CD8^+$  T Zellen beider Kulturen in der Lage sind, eine große Zahl  $\text{IFN-}\gamma$  Produzenten hervorzubringen. Interessanterweise zeigten  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen jedoch konsistent verdoppelte Zellzahlen, die große  $\text{IFN-}\gamma$  Mengen produzierten, verglichen mit  $CD152^{+/+}$   $CD8^+$  T Zellen. **Abbildung 10** zeigt, dass der Prozentsatz  $\text{IFN-}\gamma$  produzierender  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen an Tag 2 57% und an Tag 3 30,4% betrug.  $CD152^{+/+}$   $CD8^+$  T Zellen generierten dagegen lediglich 38,9%  $\text{IFN-}\gamma$  Produzenten an Tag 2 und 18,1% an Tag 3. Auch der Vergleich des geometrischen Mittels aller  $CD8^+$  T Zellen in den Diagrammen bestätigt die stark gesteigerte  $\text{IFN-}\gamma$  Produktion der  $CD152$  defizienten T Zellen. So betrug das geometrische Mittel der  $\text{IFN-}\gamma$  Färbung von  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen 137,3 an Tag 2 und 39,5 an Tag 3 im Gegensatz zu 59,1 an Tag 2 und 26,8 an Tag 3 in der  $CD152^{+/+}$   $CD8^+$  T Zell Population. Das bedeutet, dass die erhöhten  $\text{IFN-}\gamma$  Konzentrationen in Überständen von  $CD8^+$  T Zell Kulturen, bei denen  $CD152$  genetisch inaktiviert war, nicht auf eine größere Anzahl sondern auf einen größeren Prozentsatz von  $\text{IFN-}\gamma$  produzierenden  $CD8^+$  T Zellen zurückzuführen war. Die Kontrollfärbung, bei der die Bindungsstellen des Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers durch Überschusszugabe eines unkonjugierten Antikörpers mit derselben Spezifität blockiert wurden, zeigt zudem, dass der verwendete anti- $\text{IFN-}\gamma$  Antikörper selektiv an die Epitope des  $\text{IFN-}\gamma$  gebunden hatte und somit einen präzisen Nachweis dieses Zytokins ermöglichte (**Abbildung 10, obere Reihe**).

#### 4.2.1 Serologische $CD152$ -Blockade erhöht die Anzahl $\text{IFN-}\gamma$ produzierender $CD8^+$ T Zellen

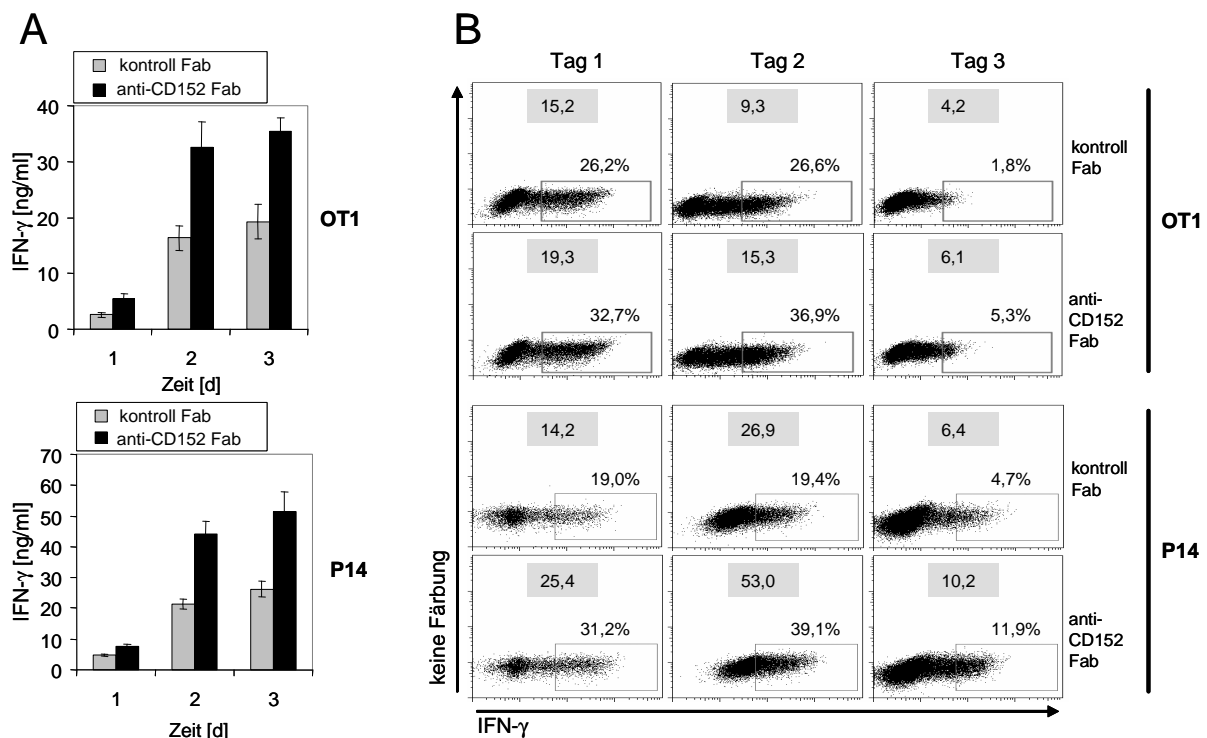
In den bisher dargestellten Versuchen wurden die durch  $CD152$  vermittelten Effekte auf  $CD8^+$  T Zellen durch den Vergleich von 2 Maus-Inzucht-Linien, bei denen  $CD152$  genetisch aktiv oder inaktiviert war ( $CD152^{+/+}$  vs.  $CD152^{-/-}$ ), untersucht. Zum Unterschied davon ermöglicht eine antagonistische serologische Blockade von  $CD152$  durch Fab-Fragmente die Untersuchung von  $CD8^+$  T Zellen aus ein und demselben Tier. Um außerdem sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte nicht nur charakteristisch für die bestimmte Affinität des transgenen TZR für das  $\text{OVA}_{257-264}$  Peptid (OT1) sind, wurde die serologische Blockade von

CD152 zusätzlich mit einer weiteren, für das Peptid GP33, antigenspezifischen TZR-transgenen Mauslinie (P14) durchgeführt (**Abbildung 11A & 10B**). Die Spezifität der serologischen CD152 Blockade wurde kontrolliert, indem identisch stimulierte T Zell-Kulturen, statt mit CD152 blockierenden mit Isotyp-Fab-Fragmenten behandelt wurden (**Abbildung 11A graue Balken & 10B obere Diagramme**).

Naive CD8<sup>+</sup> T Zellen aus den TZR transgenen Mauslinien OT1 und P14 wurden jeweils antigenspezifisch mit 1 µg/ml OVA<sub>257-264</sub> Peptid, bzw. 0,1 µg/ml GP33 Peptid, und kongenen APZ stimuliert. An den Tagen 1, 2 und 3 nach Beginn der antigenspezifischen Stimulation wurde im Überstand der CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen von OT1 und P14 Mäusen die IFN-γ Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kulturen beider transgener Mauslinien nach CD152 Blockade deutlich mehr IFN-γ produzieren verglichen mit identisch stimulierten Zellkulturen, bei denen CD152 nicht blockiert wurde (**Abbildung 11A**). Die IFN-γ Konzentration stieg im Überstand von TZR-transgenen OVA<sub>257-264</sub> Peptid-spezifischen OT1 Kulturen, bei denen CD152 blockiert worden war, von 5 ng/ml an Tag 1 auf ein Maximalwert von 35 ng/ml Tag 3 an. OT1-Kulturen, bei denen CD152 nicht blockiert worden war, erreichten eine Konzentration von lediglich 19 ng/ml an Tag 3 und sezernierten damit etwa nur die Hälfte an IFN-γ (**Abbildung 11A, oberes Diagramm**). Die IFN-γ Konzentrationen in den Überständen der TZR-transgenen GP33-Peptid spezifischen P14-Kulturen waren insgesamt etwas höher als in denen der OT1 Kulturen, wobei der Unterschied zwischen den CD152 blockierten und nicht blockierten erhalten blieb. In P14 Kulturen, bei denen CD152 serologisch mittels antagonistischen Fab-Fragmenten blockiert wurde, stieg die IFN-γ Konzentration von 8 ng/ml an Tag 1 auf 52 ng/ml an Tag 3, im Gegensatz zu Isotyp-behandelten Kulturen, in denen ein Anstieg auf 26 ng/ml an Tag 3 erfolgte (**Abbildung 11A, unteres Diagramm**). Das bedeutet, dass CD8<sup>+</sup> T Zellen mit verschiedenen voneinander unabhängigen Antigen-spezifitäten (OVA<sub>257-264</sub>- und GP33-Peptid) doppelte Mengen IFN-γ sezernieren, wenn CD152 serologisch blockiert wird.

Auch die durchflusszytometrische Analyse der IFN-γ Konzentrationen auf Einzelzellebene mittels intrazellulärer Färbung bestätigte die Zunahme der IFN-γ<sup>high</sup> Produzenten durch serologische Blockade, die auch bei der genetischen Inaktivierung beobachtet wurde (**Abbildung 11B**). Der Prozentsatz von IFN-γ Produzenten in OVA<sub>257-264</sub> Peptid antigenspezifischen Kontroll-Kulturen betrug 26,2% an Tag 1, 26,6% an Tag 2 und 1,8% an Tag 3 im Vergleich zu 32,7%, 36,9% und 5,3% in gleichen Kulturen, bei denen jedoch

CD152 durch Zugabe von Fab-Fragmenten serologisch antagonisiert war (**Abbildung 11B, obere Diagramme**). Die Zunahme der IFN- $\gamma$  Produzenten in der Population CD152 blockierter CD8<sup>+</sup> OT1 Lymphozyten spiegelte sich auch in dem Anstieg des geometrischen Mittels dieser Zellkulturen wider. Im Gegensatz zu Isotyp-Fab behandelten OT1 Kulturen, die einen maximalen Wert von 15,2 an Tag 1 erreichten, stieg das geometrische Mittel der Kulturen bei denen CD152 serologisch blockiert wurde auf 19,3 (**Abbildung 11B, obere Diagramme**). Der Prozentsatz von IFN- $\gamma$  Produzenten in TZR transgenen GP33-Peptid spezifischen Isotyp-Kontroll-Kulturen betrug 19,0% an Tag 1, 19,4% an Tag 2 und 4,7% an Tag 3 im Vergleich zu 31,2%, 39,1% und 11,9% in Kulturen, bei denen CD152 antagonisiert war (**Abbildung 11B, untere Diagramme**). Das geometrische Mittel erhöhte sich von 14,2 an Tag 1 in Isotyp-behandelten Kulturen auf 25,4 in Kulturen, bei denen CD152 serologisch



**Abbildung 11:** Serologische CD152-Blockade erhöht die IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen unabhängig von der Spezifität des TZR. Naive CD8<sup>+</sup> T Zellen aus TZR-antigenspezifischen OT- (obere Diagramme), bzw. P14-(untere Diagramme) Mäusen wurden entweder mit 1  $\mu$ g/ml OVA<sub>257-264</sub> oder 0,1  $\mu$ g/ml GP33 Peptid und APZ antigenspezifisch stimuliert. Die Kulturen wurden mit CD152-spezifischen- und Kontroll-Fab-Fragmenten angesetzt. **A)** Die IFN- $\gamma$  Konzentration in den Überständen der Zellkulturen wurde an den ersten drei Tagen nach initialer Aktivierung mittels ELISA bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von jeweils 3 identischen Wiederholungen auf einer 96-well Mikrotiterplatte im ELISA-Test. **B)** Die intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentrationen in CD8<sup>+</sup> T Zellen derselben Kulturen wurde zu den gleichen Zeitpunkten außerdem mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Prozente beziehen sich auf die CD8<sup>+</sup> T Zell Population, die hohe Mengen an IFN- $\gamma$  produzieren. Die grau hinterlegten Zahlen bedeuten das geometrische Mittel der Prozentsätze aller CD8<sup>+</sup> T Zellen. Ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche ist dargestellt.

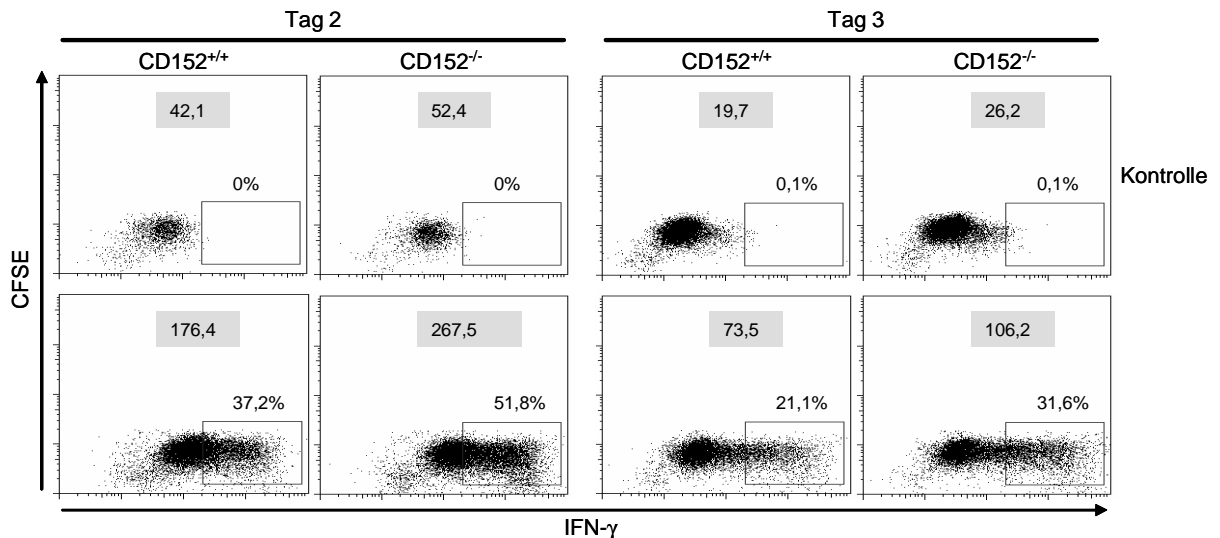
blockiert wurde (**Abbildung 11B, obere Diagramme**). Diese Daten zeigen, dass durch die serologische Blockade von CD152 mittels spezifischer antagonistischer Fab-Fragmente der Prozentsatz von IFN- $\gamma$  Produzenten in CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen mit 2 unabhängigen TZR-Affinitäten und -Spezifitäten stark zunimmt.

#### 4.2.2 Die hemmende Wirkung von CD152 auf die IFN- $\gamma$ Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen ist Zell-intrinsisch

Um herauszufinden, ob die durch CD152 Signale vermittelte Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion während primärer Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen kein indirekter Effekt ist, der durch andere Zelltypen oder das Zytokinmilieu in der Zellkultur verursacht wird, wurden CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen simultan in Ko-Kulturen stimuliert. Für diese Versuche wurden naive TZR-spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen entweder aus CD152<sup>+/+</sup> oder aus CD152<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem Zytoplasmamembran-permeablen fluoreszierenden Zellfarbstoff CFSE angefärbt und darauf folgend zusammen mit ihrem ungefärbten Pendant in derselben Kultur antigenspezifisch stimuliert. Um außerdem eventuelle Effekte der CFSE-Färbung auf den Zellmetabolismus auszuschließen, wurde die intrazelluläre IFN- $\gamma$  Produktion anschließend lediglich in den CFSE-negativen CD8<sup>+</sup> T Zellen untersucht. Zusätzlich wurde das Experiment vice versa durchgeführt, wobei entweder die CD152<sup>+/+</sup> oder die CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen mit CFSE gefärbt wurden.

Durch diesen experimentellen Ansatz war es möglich, CD152-kompetente und -defiziente CD8<sup>+</sup> T Zellen in derselben Kultur anhand der CFSE-Färbung zu unterscheiden. An den Tagen 1 bis 3 nach primärer Stimulation wurde die intrazelluläre IFN- $\gamma$  Produktion individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen dann durchflußzytometrisch bestimmt. Wie in **Abbildung 12** gezeigt ist, beeinflusst das Ko-Kultivieren von CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen nicht die CD152 vermittelte Hemmung der IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T Zellen. Im Gegensatz zu CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen, die an Tag 2 51,8% und an Tag 3 31,6% IFN- $\gamma$  positive Zellen generierten, produzierten CD152<sup>+/+</sup> T Zellen nur einen Prozentsatz von 37,2% an Tag 2 und 21,1% an Tag 3 der CD152<sup>-/-</sup> IFN- $\gamma$  positiver Zellen (**Abbildung 12**). Auch das geometrische Mittel der IFN- $\gamma$  Färbung war mit 267,5 und 106,2 in CD152 defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen an Tag 1 und 2 im Vergleich zu 176,4 und 73,5 in CD152 kompetenten CD8<sup>+</sup> T Zellen deutlich erhöht (**Abbildung 12**). Das bedeutet, dass der Einfluss von CD152 auf die Effektor-

Differenzierung individueller CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten direkt ist und nicht über andere Zelltypen oder Zytokine vermittelt wird.

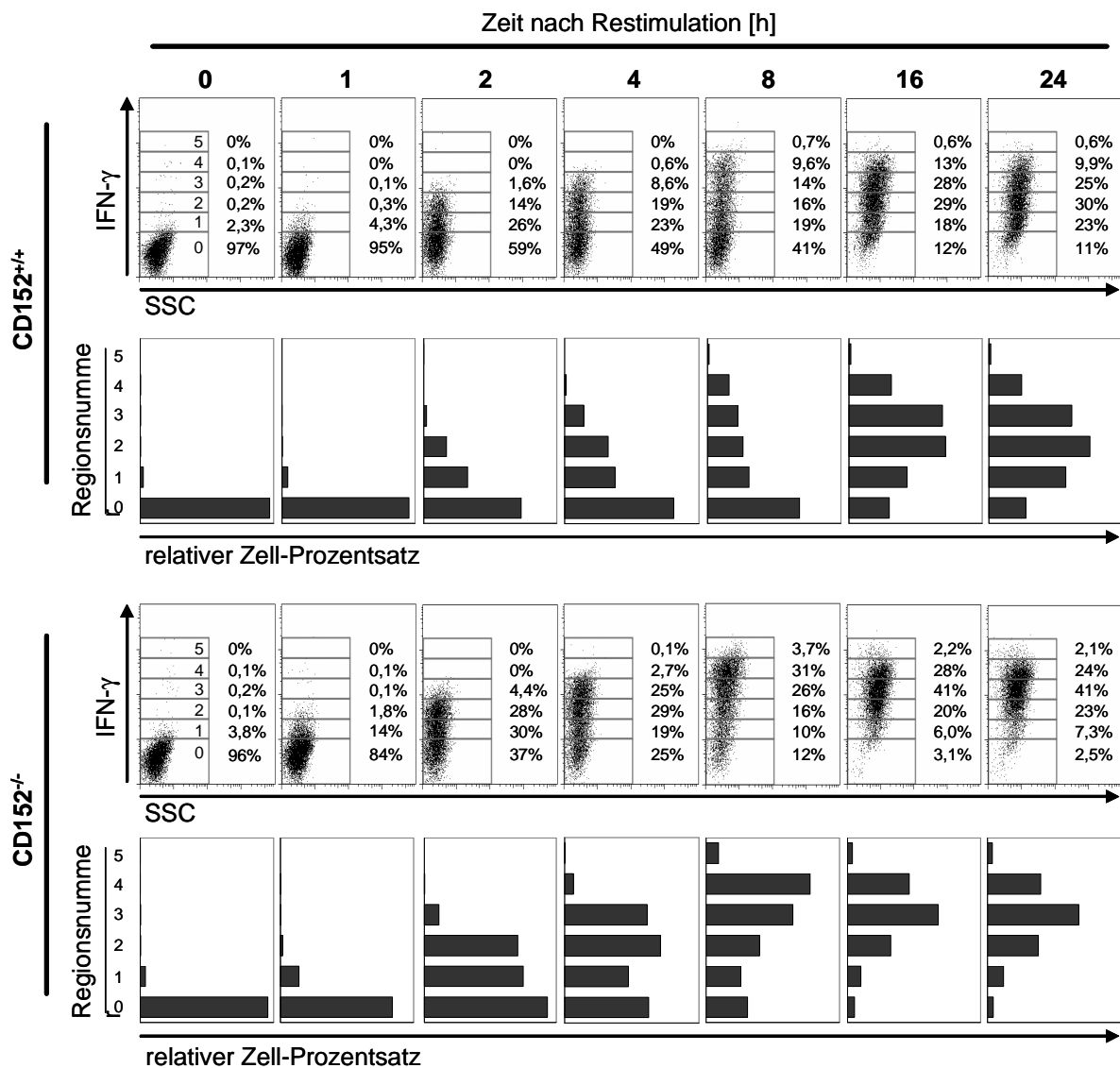


**Abbildung 12:** Die CD152 vermittelte Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen ist unabhängig von dem Zytokinmilieu in der Kultur. Ko-Kultur-Versuche: Naive OVA<sub>257-264</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> OT1 Mäusen wurden wie in Material und Methoden beschrieben zusammen antigenspezifisch primär stimuliert. Entweder die CD152<sup>+/+</sup> oder CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden zuvor mit CFSE gefärbt. Um eventuelle Einflüsse der CFSE-Färbung auf den Zellmetabolismus auszuschließen, wurde lediglich die CFSE negative Population analysiert (CFSE positive Zellen sind nicht gezeigt). Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen wurde dieses Experiment stattdessen vice versa durchgeführt, wobei entweder die CD152<sup>+/+</sup> oder CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen mit CFSE angefärbt wurden. Intrazelluläres IFN- $\gamma$  in CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> wurde durchflußzytometrisch an Tag 2 und Tag 3 detektiert. Prozente beziehen sich auf CFSE negative CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten. Vor der Fixierung der Zellen wurden die Kulturen 4 h lang mit PMA, Ionomycin und Brefeldin-A inkubiert. Grau hinterlegte Zahlen zeigen das geometrische Mittel der IFN- $\gamma$  Färbung. Block-Kontroll-Färbungen wurden durch das Hinzufügen eines unkonjugierten Antikörpers der gleichen Spezifität in 100-fachem Überschuss vor der eigentlichen Färbung mit dem konjugierten Antikörper durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche ist gezeigt.



### 4.3 Nach Restimulation ist die Effektor-Zytokin Produktion von CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen stark beschleunigt

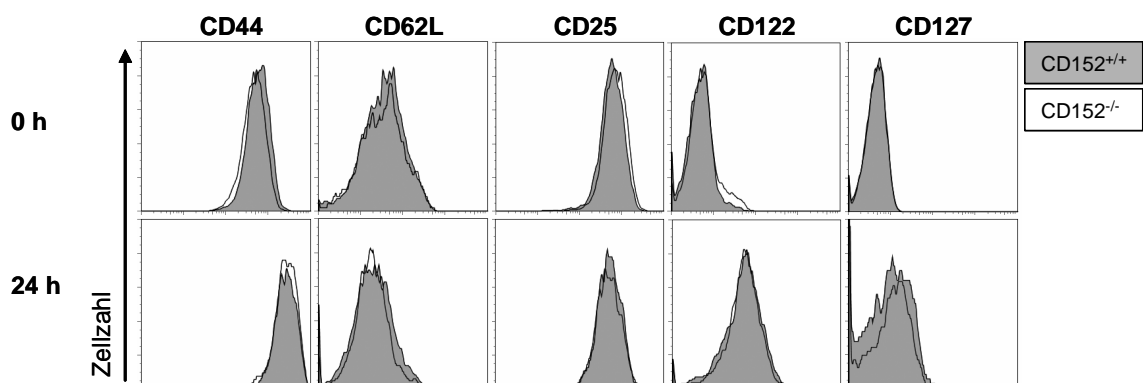
In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit CD152 Einfluss auf die Schnelligkeit der Immunantwort individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Beginn ihrer Restimulation nimmt. Hierfür wurden naive CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> Mäusen mit transgenen



**Abbildung 13:** CD152 hemmt die Schnelligkeit der IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen nach antigenspezifischer Restimulation. An Tag 8 nach initialer Aktivierung wurden die überlebenden CD8<sup>+</sup> T Zellen mit frischem Medium, APZ und OVA-Peptid wie in Material und Methoden beschrieben antigenspezifisch restimuliert. Intrazelluläres IFN- $\gamma$  wurde während der ersten 24 h der sekundären Stimulation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für eine übersichtlichere Datenanalyse wurden die gesamten CD8<sup>+</sup> T Zell Populationen in 6 Regionen unterteilt (0-5). Die korrespondierenden Balken Diagramme illustrieren die relative Zellfrequenz der CD152<sup>+/+</sup> oder CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen in den entsprechenden Regionen nach der Stärke ihres IFN- $\gamma$  Signals. Ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche ist dargestellt.

OVA<sub>257-264</sub> Peptid spezifischen TZR mit 1 µg/ml des Peptids OVA<sub>257-264</sub> und kongenen APZ stimuliert. An Tag 8 wurden die CD8<sup>+</sup> T Zellen wie in Material und Methoden beschrieben antigenspezifisch restimuliert. Darauf folgend wurde die intrazelluläre IFN-γ Produktion individueller CD8<sup>+</sup> Zellen von 0 h bis 24 h mittels FACS verfolgt. Die intrazelluläre Analyse der IFN-γ Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen in den ersten Stunden nach antigenspezifischer Restimulation offenbarte, dass die durch CD152 vermittelte Signalgebung die Induktion der IFN-γ Produktion deutlich verzögert. Zudem ist auch die Neigung der T Zellen, eine Population IFN-γ produzierender Lymphozyten zu generieren, deutlich reduziert, verglichen mit CD152 defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 13**). Durch die Unterteilung der Punktdiagramme aller CD8<sup>+</sup> T Zellen in 6 durchnummerierte Regionen (0-5) konnten Teilpopulationen von CD8<sup>+</sup> T Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzstärke der IFN-γ Färbung zusammengefasst und dadurch besser verglichen werden (**Abbildung 13**). Als eindrucksvolles Beispiel sei hier die IFN-γ Färbung 8 h nach Restimulation aufgeführt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich schon ca. 3mal mehr (31%) der CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten in der Region 4 verglichen mit lediglich 9,6% der CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass CD152 speziell die frühe IFN-γ Produktion und deren Induktion in CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten nach wiederholtem Antigenkontakt hemmt.

Um auszuschließen, dass CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen sich vor und während der sekundären Immunantwort eventuell in einem unterschiedlichen Differenzierungszustand befanden, wurde auch die Expression typischer Oberflächen-Aktivierungsmarker



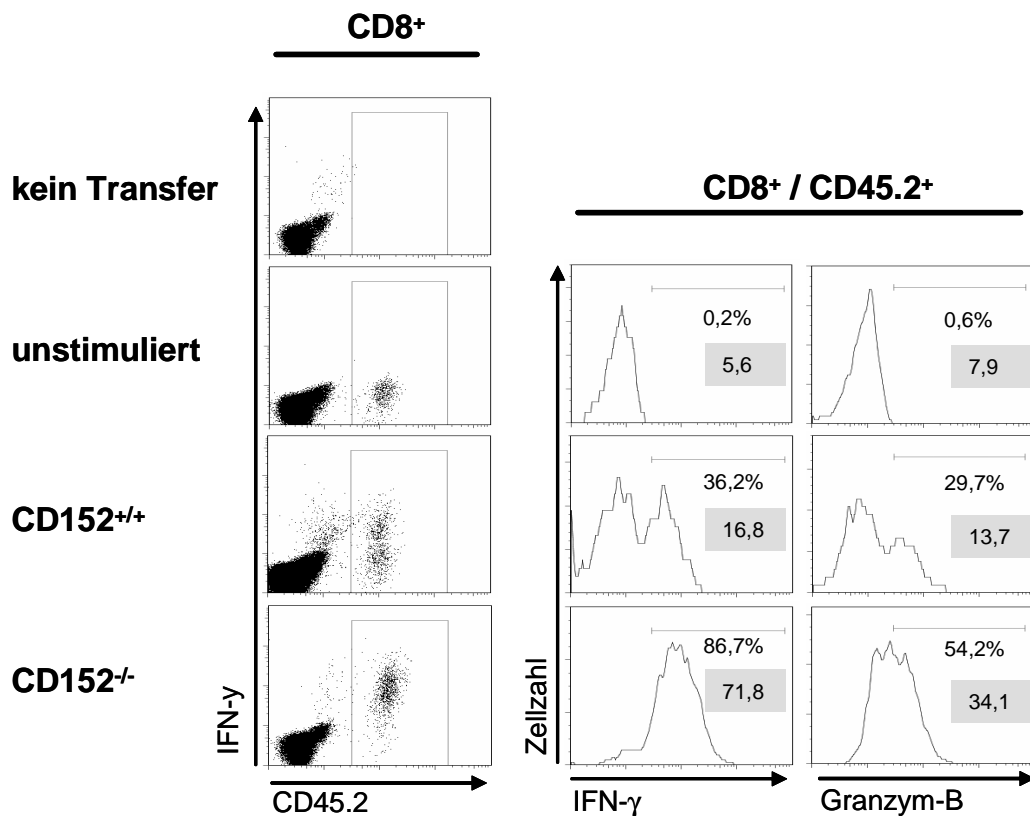
**Abbildung 14:** Der Aktivierungszustand stimulierter und unstimulierter CD152-kompetenter und -defizienter CD8<sup>+</sup> T Zellen war vergleichbar. Gezeigt ist die durchflußzytometrische Analyse der angegebenen Oberflächen-Aktivierungsmarker auf CD152<sup>+/+</sup> (grau schattiert) und CD152<sup>-/-</sup> (transparent) CD8<sup>+</sup> T Zellen 0 h und 24 h nach antigenspezifischer Restimulation an Tag 8. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

durchflußzytometrisch vergleichend bestimmt. Wie die Ergebnisse offenbarten, war die Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L, CD25, CD122 und CD127 zwischen CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen vor (0 h) und nach (24 h) Beginn der sekundären Immunantwort vergleichbar (**Abbildung 14**). Diese Ergebnisse belegen, dass sich TZR transgene CD152<sup>+/+</sup> wie auch CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen in diesem Zeitraum, zumindest phänotypisch, in einem analogen Differenzierungsstadium befanden.

#### **4.4 Primäre in vivo Stimulation bestätigt die in vitro beobachtete CD152 vermittelte Hemmung der CD8<sup>+</sup> Effektorpopulation**

Um aufzuklären, ob restimulierte CD152 defiziente CD8<sup>+</sup> T Zellen auch dann verstärkt IFN- $\gamma$  produzieren, wenn sie in vivo anstatt in vitro primär stimuliert worden waren, wurde die IFN- $\gamma$  Produktion von CD8 T Zellen untersucht, die zuvor eine primäre Stimulation in vivo erfahren hatten.  $1 \times 10^6$  naiv sortierte (CD44<sup>low</sup>, CD62L<sup>high</sup>), CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> OVA<sub>257-264</sub> spezifische OT1-CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden dafür i.v. in kongene CD45.1 Mäuse injiziert, die 24 h später mit anti-DEC-OVA und anti-CD40 Antikörpern immunisiert wurden (siehe Material und Methoden). Durch Einsatz dieser Immunisierungsmethode wird das Antigen den T Zellen gezielt auf maturierten DZ präsentiert, was in einer starken Immunantwort der CD8<sup>+</sup> T Zellen resultiert (Bonifaz et al., 2004). Um die Entstehung toleranter T Zellen durch Antigenpräsentation von nicht maturierten DZs zu vermeiden, wurden gleichzeitig anti-CD40-Antikörper verabreicht, welche eine Aktivierung und Reifung der endogenen DZ sicherstellen. 8 Tage später wurden die Milzen und peripheren Lymphknoten der jeweiligen Empfängertiere ex vivo vereinigt und 16 h lang dem Antigen OVA<sub>257-264</sub> bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  in einer in vitro Kultur ausgesetzt. Wie in **Abbildung 15** dargestellt ist, generierten CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>-/-</sup> Mäusen eine größere Anzahl an IFN- $\gamma$  und Granzym-B Produzenten verglichen mit solchen aus CD152<sup>+/+</sup> Mäusen. Unter diesen Bedingungen produzierten 86,7% der CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen IFN- $\gamma$ , im Vergleich zu weniger als der Hälfte (36,2%) der CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 15**). Dies spiegelte sich auch im geometrischen Mittel dieser Färbungen wider, das bei den CD152 defizienten Lymphozyten 71,8 und bei den CD152 kompetenten 16,8 betrug (**Abbildung 15**). Ebenso lag die Anzahl der Granzym-B Produzenten mit 54,2% der CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen deutlich über dem Wert für CD152 exprimierende T Zellen (29,7%). Das geometrische Mittel der Granzym-B Färbung bestätigte dieses Ergebnis eindeutig (34,1 CD152<sup>-/-</sup> zu 13,7

CD152<sup>+/+</sup>). Unstimulierte Kontrollen zeigten eine vernachlässigbare IFN- $\gamma$  und Granzym-B Hintergrundfärbung von 0,2%-0,6% und demonstrieren die Spezifität der Färbungen. Mäuse die anstatt einer Immunisierung mit dem Antigen lediglich PBS erhielten, wurden als Spezifitätskontrolle für die Detektion der adoptiv transferierten Zellen verwendet (**Abbildung 15, obere Reihe, kein Transfer**). Der spezifische Nachweis von IFN- $\gamma$  und Granzym-B wurde durch nicht restimulierte vereinigte CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> TZR transgene CD8<sup>+</sup> T



**Abbildung 15:** Primäre Stimulation *in vivo* beeinflusst nicht den hemmenden Effekt von CD152 auf die Effektormolekül-Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen. Naive OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> Mäusen wurden *i.v.* in kongene CD45.1 Empfängertiere injiziert. 24 h später wurden die Mäuse *i.p.* mit anti-DEC-OVA und anti-CD40 Antikörpern immunisiert. An Tag 9 wurden die Tiere getötet, Milz und periphere Lymphknoten vereinigt und *in vitro* mit OVA<sub>257-264</sub> wie in Material und Methoden beschrieben restimuliert. 16 h nach Beginn der Restimulation wurde in den Kulturen intrazelluläres IFN- $\gamma$  und Granzym-B angefärbt. Punktdiagramme auf der linken Seite zeigen IFN- $\gamma$  expression (Y-Achse) der transferierten CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (X-Achse). Als Spezifitätskontrolle der IFN- $\gamma$  und Granzym-B Färbungen wurden Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> transferierten Mäusen verwendet. Diese Zellen blieben während der *in vitro* Kultivierung unstimuliert. Als Spezifitätskontrolle des CD45.2 Antikörpers wurden Mäuse verwendet, die kein Zelltransfer erhielten. Histogramme auf der rechten Seite zeigen IFN- $\gamma$  und Granzym-B-Expression (X-Achse) der in den Punktdiagrammen spezifizierten CD8<sup>+</sup> / CD45.2<sup>+</sup> T Zell Populationen. Prozente beziehen sich auf die IFN- $\gamma$  und Granzym-B positiven Populationen, grau hinterlegte Zahlen auf das geometrische Mittel aller in den Histogrammen dargestellten CD8<sup>+</sup> / CD45.2<sup>+</sup> T Zellen.

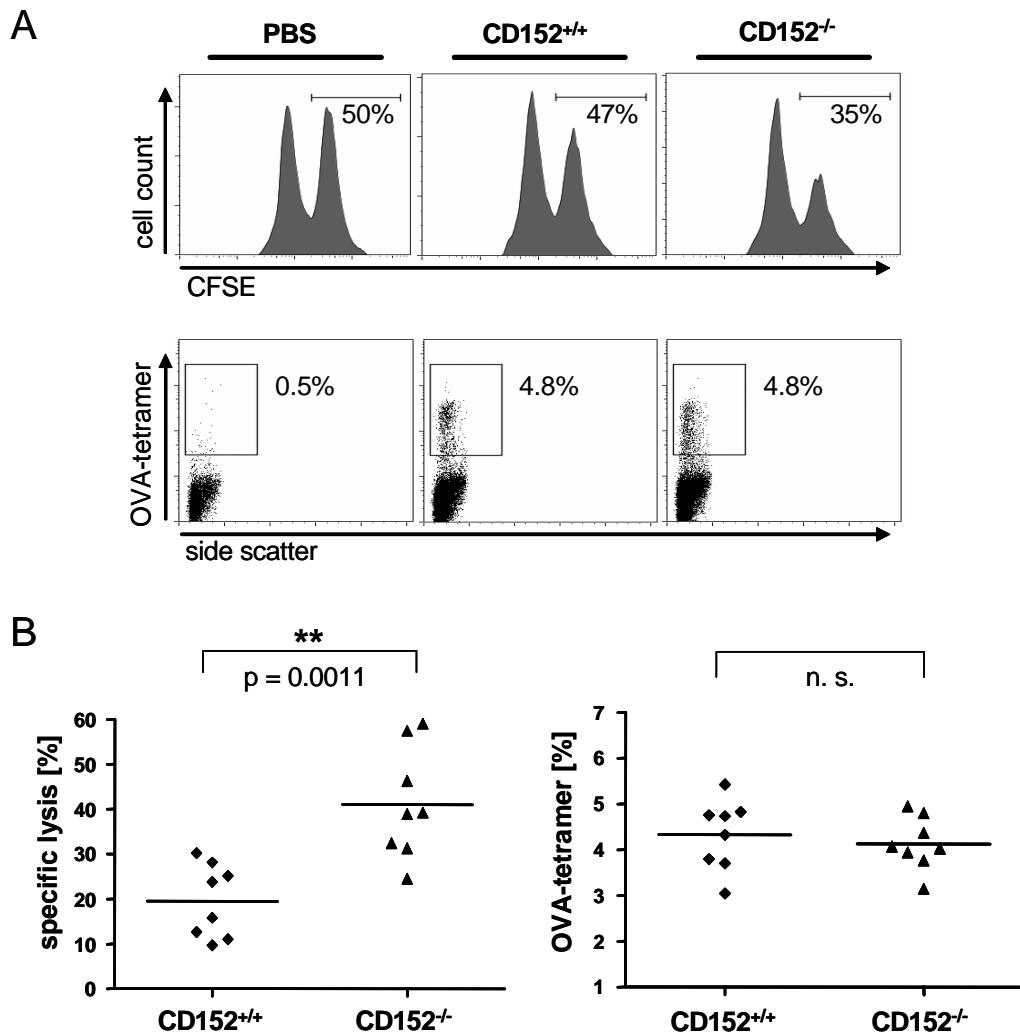
Zellen sichergestellt (**Abbildung 15, zweite Reihe, unstimuliert**). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Versuche, bei denen die CD8<sup>+</sup> T Zellen in vitro primär stimuliert worden waren, und demonstrieren, dass die Effektor-Molekül-Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen durch CD152 auch unter einer physiologischen in vivo Situation gehemmt wird.

#### **4.5 CD152 reguliert die Zytotoxizität individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen in vivo**

Um zu untersuchen, ob die Fähigkeit von CD8<sup>+</sup> T Zellen, Zielzellen antigenspezifisch zu lysieren, durch CD152 Signale gehemmt wird, kam ein in vivo Zytotoxizitäts-Test zum Einsatz, der in Kombination mit der Färbung OVA<sub>257-264</sub> antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T Zellen mittels MHC-I restringierter Tetramere eine relativ physiologische Untersuchung der Zytotoxizität individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen in vivo ermöglicht (Hernandez et al., 2001). Die verwendeten Tetramere bestehen aus vier miteinander verbunden MHC-I Molekülen, die alle das OVA<sub>257-264</sub> Peptid präsentieren. Weil dieser Molekülkomplex außerdem mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert ist, kann mit Hilfe dieser Methode ein selektiver Nachweis der für dieses Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen erfolgen.

Jeweils  $1 \times 10^6$  naiv sortierte OVA<sub>257-264</sub> spezifische TZR-transgene CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> OT1 Mäusen wurden i.v. in kongene C57Bl/6 Empfängertiere injiziert, welche 24 h später i.p. mit anti-DEC-OVA und anti-CD40 immunisiert wurden. 9 Tage später wurde der in vivo Zytotoxizitäts-Test mittels i.v. Injektion eines CFSE gefärbten Zielzellgemischs durchgeführt (siehe Material und Methoden). 3 h nach der Injektion des Zielzellgemischs wurden die Mäuse getötet, die Milz und die axillaren sowie inguinalen Lymphknoten vereinigt und die spezifische Lyse mittels der durchflußzytometrischen Analyse der Zellfrequenzen von antigenbeladenen (CFSE<sup>high</sup>) relativ zu antigenunbeladenen (CFSE<sup>low</sup>) Zellen quantifiziert. Empfängertiere, die CD152 defiziente CD8<sup>+</sup> T Zellen erhalten hatten, zeigten reproduzierbar eine verdoppelte antigenspezifische Zytotoxizität verglichen mit Tieren, die CD152 kompetente CD8<sup>+</sup> T Zellen erhalten hatten (**Abbildung 16A, obere Reihe**). Als Kontrolle für die Antigen-spezifität der Zytotoxizität in vivo wurde auch die Lyse in Mäusen bestimmt, die anstatt antigenspezifischer OT1 CD8<sup>+</sup> Effektor-Zellen lediglich PBS injiziert bekamen. Diese Mäuse zeigten keine messbare Lyse der CFSE<sup>high</sup> Fraktion (**Abbildung 16A, oben links**). Die mittlere spezifische Lyse in Mäusen (n=8), die CD152<sup>+/+</sup> Zellen erhalten hatten, war signifikant (p=0,0011) niedriger (19%) verglichen mit 41% in

Tieren, die  $CD152^{-/-}$  Zellen injiziert bekommen hatten (**Abbildung 16B**). Um sicherzustellen, dass vergleichbare Prozentsätze von Effektor-Zellen in den Empfängertieren vorhanden waren und die Unterschiede der spezifischen Lyse nicht auf die Häufigkeit der Effektor-Zellen



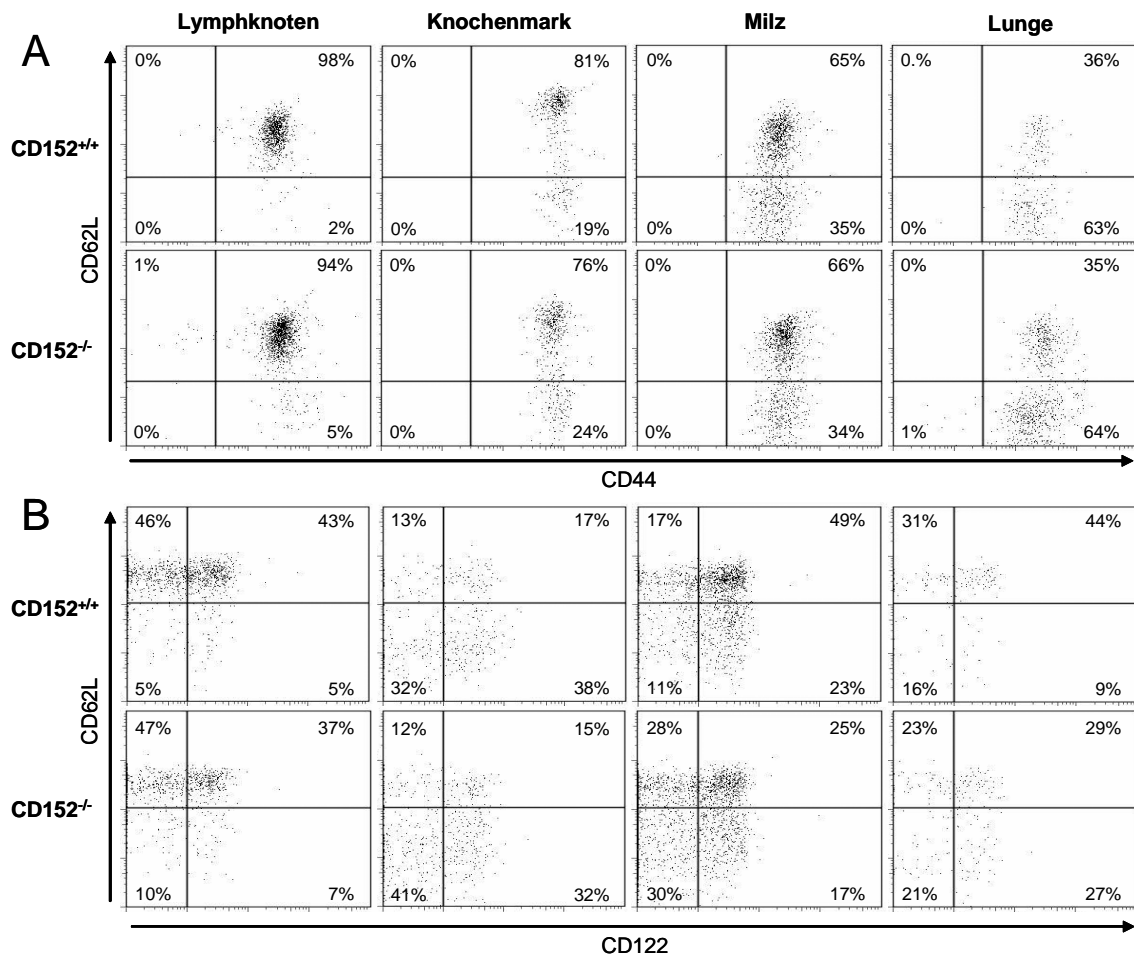
**Abbildung 16:**  $CD152$  hemmt die Zytotoxizität individueller  $CD8^+$  T Zellen in vivo. Naive  $OVA_{257-264}$  antigenspezifische  $CD152^{+/+}$  und  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen wurden i.v. in kongene C57Bl/6 Mäuse injiziert. 24 h später wurden die Mäuse i.p. mit anti-DEC-OVA und anti-CD40 Antikörpern immunisiert. An Tag 9 wurde den Empfängertieren ein Gemisch aus CFSE gefärbten Zielzellen i.v. injiziert, wie in Material und Methoden beschrieben. 3 h nach der Injektion des Zielzellgemischs wurden die Tiere getötet, die Milz und die axillaren sowie inguinalen Lymphknoten wurden vereinigt und der Prozentsatz der CFSE<sup>+</sup> Zielzellen und die Anzahl der antigenspezifischen  $CD8^+$  T Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. **A**) Die oberen Histogramme repräsentieren die Verteilung des CFSE-gefärbten Zielzellgemischs in Mäusen, die entweder  $CD152^{+/+}$  oder  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen injiziert bekommen haben. Die korrespondierenden unteren Punktdiagramme repräsentieren Tetramer-Färbungen aller  $CD8^+$  T Zellen, die aus den jeweiligen Mäusen isoliert wurden. Prozente beziehen sich auf  $CD8^+$   $OVA_{257-264}^+$  T Zellen, bezogen auf die gesamte  $CD8^+$  T-Zell-Population. **B**) Die Ergebnisse aller untersuchten Tiere sind dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt ( $n=8$ ). [n.s. = nicht signifikant]

zurückzuführen war, wurden die OVA<sub>257-264</sub> Peptid spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen mittels MHC-I restringierter Tetramere angefärbt (**Abbildung 16A, untere Reihe**). Die Prozentsätze der OVA<sub>257-264</sub> Peptid antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> Effektor-Zellen waren mit 4,8% vergleichbar in beiden Gruppen (**Abbildung 16B, rechte Seite**). Diese neuen Ergebnisse verdeutlichen, dass die frühe Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T Zellen fast 2-fach verstärkt ist, wenn CD152 ausgeschaltet ist, und zwar nicht durch eine größere Anzahl an Effektor-Zellen, sondern durch Verstärkung der individuellen Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T Zellen.

## 4.6 Effekte von CD152 auf die Bildung von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen

Um zu untersuchen, ob CD152 Einfluss auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Gedächtnisbildung nimmt, wurden naiv sortierte OVA<sub>257-264</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> Mäusen i.v. in kongene CD45.1 Empfängertiere injiziert, welche 24 h später mit anti-DEC-OVA und anti-CD40 immunisiert wurden (siehe Material und Methoden). An Tag 80 nach der Immunisierung wurden bestimmte lymphatische (Milz, Lymphknoten, Knochenmark) und nicht lymphatische Organe (Lunge) isoliert und entweder auf die Expression typischer Gedächtnismarker analysiert, oder aber ex vivo antigenspezifisch mit 1 µg/ml OVA<sub>257-264</sub> Peptid restimuliert (siehe Material und Methoden). Zusätzlich wurde für eine funktionelle Charakterisierung ein 8 h dauernder in vivo Zytotoxizitäts-Test durchgeführt. Adoptiv transferierte OVA<sub>257-264</sub> spezifische CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen zeigten nach 80 Tagen beide eine vergleichbare Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD62L, CD44 und CD122 in den peripheren Lymphknoten, der Milz, der Lunge und im Knochenmark (**Abbildung 17**). Der Prozentsatz der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten, die CD62L auf der Oberfläche exprimierten, sank von Lymphknoten (98% CD152<sup>+/+</sup> zu 94% CD152<sup>-/-</sup>) über Knochenmark (81% CD152<sup>+/+</sup> zu 76% CD152<sup>-/-</sup>), Milz (65% CD152<sup>+/+</sup> zu 66% CD152<sup>-/-</sup>) und Lunge (36% CD152<sup>+/+</sup> zu 35% CD152<sup>-/-</sup>) ab (**Abbildung 17A**). Die Expression von CD44 lag in allen analysierten Organen bei nahezu 100% (**Abbildung 17A**). Die Analyse der CD122 Expression, obgleich mit Schwankungen der Werte verbunden, ergab lediglich einen Trend zu höheren Zellfrequenzen CD122 positiver CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen im Vergleich zu CD152<sup>-/-</sup> T Zellen (**Abbildung 17B**). Dessen ungeachtet weisen die durchgeführten Langzeit-in-vivo-Versuche eine große Normalabweichung der Ergebnisse auf, so dass sich keine Unterschiede in der Expression typischer Aktivierungsmarker nachweisen ließen. Das könnte bedeuten, dass diese Expressionen eher indirekt vermittelt werden.

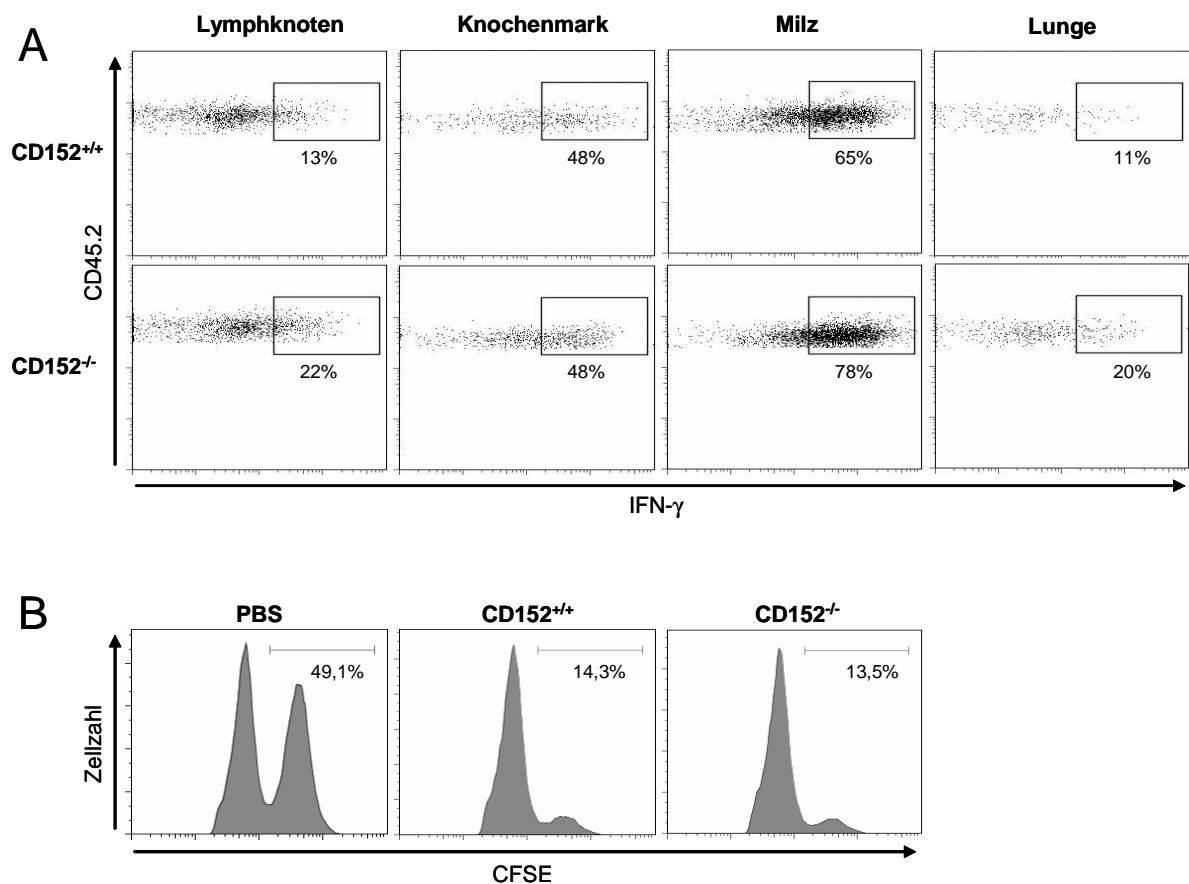
Der Vergleich der Effektor-Funktionen adoptiv transferierter  $CD152^{+/+}$  und  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen nach der ex vivo Restimulation nach 80 Tagen mit  $1 \mu\text{g/ml}$  OVA<sub>257-264</sub> Peptid deutet auf eine zwar nicht signifikante, aber dennoch selektive Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion durch CD152 hin.  $CD152$  defiziente  $CD8^+$  T Zellen bilden in den Lymphknoten (13%  $CD152^{+/+}$  zu 22%  $CD152^{-/-}$ ), der Milz (65%  $CD152^{+/+}$  zu 78%  $CD152^{-/-}$ ) und in der Lunge (11%  $CD152^{+/+}$  zu 20%  $CD152^{-/-}$ ) größere Zellpopulationen von IFN- $\gamma$  Produzenten aus (Abbildung 18A).



**Abbildung 17:** *CD152 hat keinen eindeutigen Einfluss auf die Expression typischer aktivierungsinduzierter Oberflächenmoleküle von  $CD8^+$  T-Gedächtnis-Zellen in vivo. Naive OVA-spezifische  $CD152^{+/+}$  und  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen ( $CD45.1/CD45.2^+$ ) wurden i.v. in kongene  $CD45.1^+/CD45.2^-$  Mäuse injiziert. 24 h später wurden die Mäuse i.p. mit anti-DEC-OVA und anti-CD40 Antikörpern immunisiert. An Tag 80 wurden die Empfängertiere geopfert, Milzen, periphere Lymphknoten, Knochenmark und Lungen wurden isoliert und die transferierten  $CD45.2^+$   $CD8^+$  T Zellen wurden durchflußzytometrisch auf die Oberflächenexpression spezifischer aktivierungsinduzierter Moleküle analysiert. **A)** Gezeigt sind  $CD45.2^+$   $CD8^+$  T Zellen die mit konjugierten Antikörpern gegen CD62L und CD44 gefärbt wurden. **B)**  $CD45.2^+$   $CD8^+$  T Zellen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gegen CD62L und CD122 gefärbt. Prozente beziehen sich auf die Zellhäufigkeiten in den jeweiligen Quadranten, bezogen auf alle  $CD8^+$  T Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.*



Der nach Restimulation des Knochenmarks gemessene Prozentsatz IFN- $\gamma$  positiver CD8<sup>+</sup> T Zellen lag mit 48% in CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> auf vergleichbarem Niveau. Der funktionelle Nachweis von Effektor-Funktionen der transferierten Zellen mittels des in vivo-Zytotoxizitäts-Tests zeigt, dass sowohl CD152-kompetente als auch -defiziente CD8<sup>+</sup> T Zellen in der Lage sind, während der 8 h Inkubationszeit die Zielzellen effektiv zu lysieren (**Abbildung 18B**). Dabei war keine bemerkenswerte Hemmung der zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup> T Zellen durch CD152 nachweisbar: die selektive Lyse der antigenbeladenen CFSE<sup>high</sup> Zielzellen betrug 14,3% für CD152<sup>+/+</sup>- im Vergleich zu 13,5% für CD152<sup>-/-</sup>-CD8<sup>+</sup>-



**Abbildung 18:** CD152 hemmt die Entwicklung der Effektor-Funktionen von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in vivo. Naive OVA-spezifische CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (CD45.2<sup>+</sup>) wurden i.v. in kongene CD45.1<sup>+</sup> Mäuse injiziert. 24 h später wurden die Mäuse i.p. mit anti-DEC-OVA und anti-CD40 Antikörpern immunisiert. **A)** 80 Tage später wurden die Empfängertiere getötet und die Milzen, periphere Lymphknoten, Knochenmark und Lungen isoliert und ex vivo mit OVA<sub>257-264</sub> Peptid für 16 h restimuliert. CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden durchflußzytometrisch auf die intrazelluläre Expression von IFN- $\gamma$  analysiert. Prozente beziehen sich auf die Zellhäufigkeiten in den jeweiligen Quadranten, bezogen auf alle Zellen. **B)** Ebenfalls nach 80 Tagen wurde durch i.v. Injektion eines CFSE gefärbten Zielzellgemischs in identisch behandelten Mäusen ein 8 h in vivo Zytotoxizitäts-Test durchgeführt (siehe Material und Methoden). Die Histogramme zeigen alle CFSE gefärbten Zellen, wobei sich die Prozente auf die antigenbeladene CFSE<sup>high</sup> Zielzellpopulation beziehen. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen.

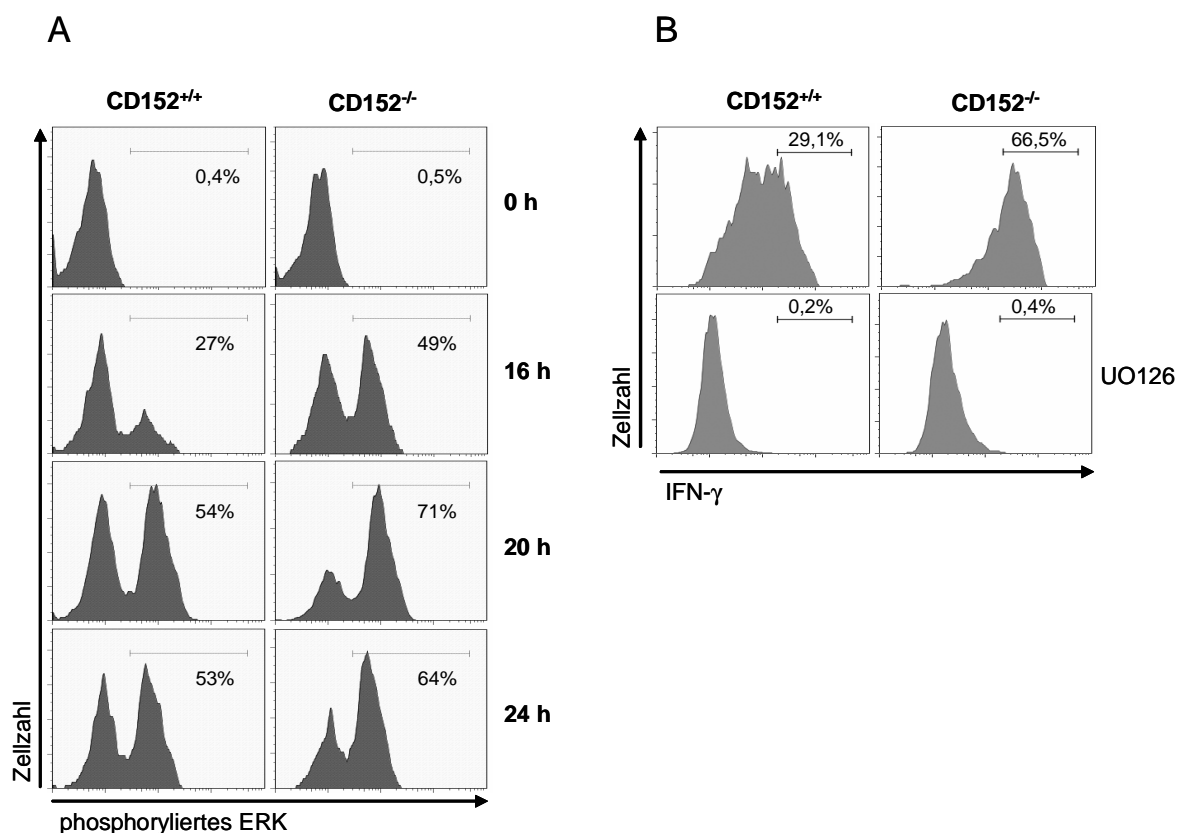
T-Zellen. Tiere, die statt CD8<sup>+</sup> Effektor-Zellen PBS injiziert bekamen, zeigten keine spezifische Lyse der Zielzellen (49,1%), was die Antigenpezifität des in vivo Zytotoxizitäts-Tests belegt (**Abbildung 18B**). Allerdings lag, durch die lange Inkubationszeit von 8 h, die Analyse der Zytotoxizität bei diesen Experimenten außerhalb des Zeitfensters bei dem Unterschiede der Zelllyse zwischen CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup>-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennbar sind.

Zusammengenommen zeigen die durchgeführten Langzeit-in-vivo-Versuche mit adoptiv transferierten CD8<sup>+</sup> T Zellen aus OVA<sub>257-264</sub> spezifischen CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> Mäusen keinen eindeutigen durch CD152 vermittelten Effekt auf die CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszell-Entwicklung. Beide Zelltypen waren in der Lage, sich in charakteristische T-Gedächtniszellen zu entwickeln und effektiv Zielzellen zu lysieren (**Abbildung 17**) (**Abbildung 18**). Diese Ergebnisse zeigen, dass, zumindest in dieser hier verwendeten Versuchsanordnung, CD152 die Gedächtniszellbildung von CD8<sup>+</sup> T Zellen entweder nicht verhindert oder jedenfalls nicht signifikant beeinflusst.

#### **4.7 Die ERK Phosphorylierung in CD8<sup>+</sup> T Zellen wird durch CD152 gehemmt**

Die Regulation der Effektor-Funktionen in T Zellen ist zu einem großen Teil von dem Aktivierungszustand von Mitgliedern der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Familie abhängig (Rincon et al., 2000). Deshalb wurde im Zuge dieser Arbeit die Phosphorylierung der MAPK-assoziierten Kinase ERK (engl.: extracellular signal-regulated kinase) in CD152-kompetenten und -defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 16 h, 20 h, und 24 h nach Beginn der antigenspezifischen Restimulation untersucht. Hierfür wurden naive TZR-transgene CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen antigenspezifisch mit 1 µg/ml des Peptids OVA<sub>257-264</sub> und kongenen APZ stimuliert. An Tag 8 nach Beginn der primären Stimulation wurden die lebenden Zellen wie in Material und Methoden beschrieben antigenspezifisch restimuliert. Die in **Abbildung 19A** gezeigten Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll, dass CD152 die ERK-Phosphorylierung hemmt. 16 h nach Beginn der Restimulation war in 49% der CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen ERK bereits phosphoryliert im Vergleich zu nur 27% in den CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen. Diese Differenz setzte sich über 20 h (71% CD152<sup>-/-</sup> zu 54% CD152<sup>+/+</sup>) bis zu 24 h (64% CD152<sup>-/-</sup> zu 53% CD152<sup>+/+</sup>) nach Restimulation fort. Das in beiden Zellpopulationen gänzlich dephosphorylierte ERK in allen CD8<sup>+</sup> T Zellen zum Zeitpunkt 0 h belegt, dass sich beide Zelltypen zu Beginn des Experiments in derselben

Ausgangssituation befanden (**Abbildung 19A**). Mit diesen Daten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die ERK-Phosphorylierung in antigenspezifisch restimulierten  $CD8^+$  T Zellen durch CD152 gehemmt wird. Zusätzlich zu diesen Versuchen wurde durch die Zugabe des ERK-Inhibitors UO126 die Phosphorylierung von ERK nach der Restimulation von  $CD8^+$  T Zellen unterdrückt. Interessanterweise führte dies 16 h nach Beginn der Restimulation zu einer stark verringerten  $IFN-\gamma$  Produktion in beiden Zellpopulationen. Ohne die Zugabe des ERK-Inhibitors waren 66,5% der TZR transgenen  $CD152^{-/-}$   $CD8^+$  T Zellen  $IFN-\gamma$  positiv im Vergleich zu lediglich 29,1% der TZR transgenen  $CD152^{+/+}$  Zellen (**Abbildung 19B, obere Diagramme**).



**Abbildung 19:** CD152 inhibiert die ERK Phosphorylierung in  $CD8^+$  T Zellen nach antigenspezifischer Restimulation. Naïve  $OVA_{257-264}$  spezifische  $CD8^+$  T Zellen aus  $CD152^{+/+}$  und  $CD152^{-/-}$  OT1 Mäusen wurden wie in Material und Methoden beschrieben an Tag 8 nach initialer Aktivierung restimuliert. **A)** Nach intrazellulärer Färbung des phosphorylierten ERK wurden durchflußzytometrische Analysen 0 h, 16 h, 20 h und 24 h nach Beginn der Restimulation durchgeführt. Die Prozente beziehen sich auf  $CD8^+$  T Zellen, welche die phosphorylierte Variante von ERK exprimieren bezogen auf die gesamte  $CD8^+$  T Zell-Population. **B)**  $CD8^+$  T Zellen wurden entweder mit APZ, OVA-Peptid und dem ERK-Inhibitor UO126 (untere Diagramme) oder nur mit APZ und  $OVA_{257-264}$  Peptid (obere Diagramme) restimuliert und auf intrazelluläre  $IFN-\gamma$  Produktion 16 h nach Beginn der sekundären Aktivierung analysiert. Prozente beziehen sich auf den Anteil  $IFN-\gamma$  produzierender Zellen bezogen auf die gesamte  $CD8^+$  T Zell-Population. Histogramme zeigen  $CD8^+$  T Zellen Warum muss das hier gesagt werden?. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

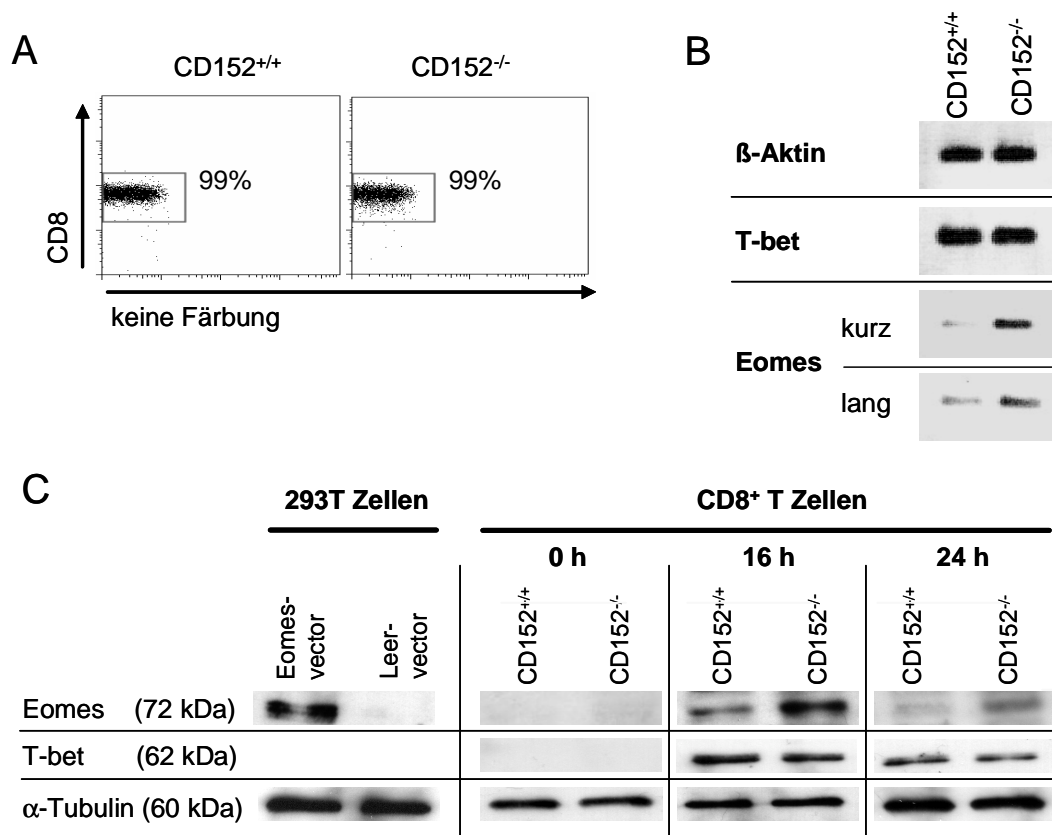
Die IFN- $\gamma$  Produktion, beider Zellpopulationen konnte durch Zugabe von UO126 aufgehoben werden (**Abbildung 19B, untere Diagramme**). Diese Ergebnisse demonstrieren die zentrale Funktion der ERK-Phosphorylierung in der Signalkaskade, die die Effektorzytokin-Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen reguliert. Des Weiteren wird deutlich, dass CD152 diesen Signalweg nutzt, um seine inhibitorische Wirkung auf die IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen auszuüben.

## 4.8 CD152 beeinflusst die transkriptionelle Regulation der Effektor-Molekül-Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen

### 4.8.1 Eomesodermin mRNA akkumuliert in CD152 defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen

Um den von CD152 genutzten Signalweg für die Regulation der Effektor-Moleküle IFN- $\gamma$  und Granzym-B experimentell genauer zu untersuchen, wurden als nächstes mRNA Mengen von Transkriptionsfaktoren, die für die Effektor-Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen verantwortlich sind, quantifiziert. In den vergangenen Jahren haben sich zwei T-box Transkriptionsfaktoren, T-bet und Eomesodermin (Eomes), als für die Regulation von Effektor-Zytokinen in CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten wichtig erwiesen (Glimcher et al., 2004; Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2003; Townsend et al., 2004). Für die Analyse der mRNA Konzentrationen wurden TZR-transgene CD152<sup>+/+</sup>- und CD152<sup>-/-</sup>-CD8<sup>+</sup> T Zellen 16 h nach antigenspezifischer in vitro Restimulation mit 1  $\mu$ g/ml OVA<sub>257-264</sub> Peptid mittels durchflußzytometrischer Zellsortierung zu einer Reinheit von  $\geq 99\%$  angereichert (**Abbildung 20A**). Aus diesen angereicherten CD8<sup>+</sup> T Zell-Populationen wurde anschließend die gesamte mRNA extrahiert. Nach der reversen Transkription der mRNA in cDNA wurden selektive PCR Amplifikationen der zu untersuchenden Gene durchgeführt. Um sicherzugehen, dass vergleichbare Mengen cDNA für die Versuche verwendet wurden, wurde die spezifische Amplifikation von  $\beta$ -Aktin als Konzentrations-Kontrolle eingesetzt.

Interessanter Weise ergab die semiquantitative Bestimmung der cDNA von T-bet und Eomes reproduzierbar eine selektive Hemmung der Gen-Transkription lediglich von Eomes und nicht von T-bet (**Abbildung 20B**). Da Eomes in zwei mRNA Varianten, einer kurzen und einer langen, existiert, wurden Primer entwickelt, mit denen es möglich war, zwischen diesen beiden Varianten zu unterscheiden. Die in **Abbildung 20B** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zu T-bet, das nicht beeinflusst ist, die Akkumulierung beider Eomes-Formen durch CD152-Signale unterdrückt wird. Diese Ergebnisse demonstrieren zum ersten Mal eine direkte hemmende Einflussnahme von CD152 auf die selektive Gen-Transkription bestimmter für die Effektor-Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen wichtiger Transkriptionsfaktoren.



**Abbildung 20:** CD152 hemmt spezifisch die Transkription und Translation des Transkriptionsfaktors Eomes. Naive OVA<sub>257-264</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> OT1 Mäusen wurden wie in Material und Methoden beschrieben an Tag 8 antigenspezifisch restimuliert. **A)** 16 h nach Beginn der sekundären Stimulation wurden die CD8<sup>+</sup> T Zellen mittels FACS zu einer Reinheit >99% angereichert. **B)** Die gesamte mRNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und für die spezifische Amplifikation von T-bet und Eomes mittels PCR eingesetzt. Als Kontrolle wurde β-Aktin verwendet. **C)** Lysate von CD8<sup>+</sup> T Zellen, die ebenfalls, wie in A) gezeigt, angereichert wurden, wurden für Western-Blot-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Restimulation verwendet. Eomes-transfizierte 293T Zellen wurden als Spezifitätskontrolle des anti-Eomes Antikörpers verwendet. α-Tubulin wurde als Proteinladekontrolle verwendet. Ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche ist dargestellt.

#### 4.8.2 CD152 hemmt die Synthese des Eomesodermin-Proteins

Um zu bestätigen, dass die beobachtete Hemmung der Eomes-mRNA-Produktion für Funktionen der Zelle relevant ist und mit den Konzentrationen des Eomes-Proteins korreliert, wurden Western-Blot-Analysen mit ebenfalls wie in **Abbildung 20A** dargestellten, durchflußzytometrisch angereicherten CD8<sup>+</sup> T Zellen durchgeführt, die zuvor mit 1 µg/ml

OVA<sub>257-264</sub> Peptid und kongenen APZ antigenspezifisch stimuliert waren. Die in **Abbildung 20C** dargestellten Ergebnisse zeigen eine CD152 abhängige Hemmung der Proteinsynthese des Transkriptionsfaktors Eomes. Die T-bet Proteinexpression wird, wie auch die mRNA Daten schon angedeutet haben, nicht durch CD152 Signale beeinflusst. Dieser regulierende Effekt von CD152 auf die Gen-Translation konnte 16 h und 24 h nach antigenspezifischer Restimulation beobachtet werden. Dass sich die T Zell Populationen bei der Restimulation in vergleichbaren Differenzierungsstadien befanden, demonstrieren die Ergebnisse zum Zeitpunkt 0 h, an dem keine Unterschiede der Proteinexpression von Eomes und T-bet zwischen CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen beobachtet werden konnten. Da der verwendete anti-Eomes Antikörper im Western-Blot neben der spezifischen auch einige Banden anderer Proteingrößen zeigt, wurde zur Bestimmung der spezifischen Bande eine Positivkontrolle aus Zelllysats von WT-Eomes transfizierten 293T Zellen verwendet (**Abbildung 20C**). Mit Hilfe der Analyse dieses Lysats war es möglich, einen exakten Nachweis des Eomes-Proteins sicherzustellen.

Zusammengenommen unterstützt der Befund, dass CD152 selektiv die Synthese des Eomesodermin-Proteins hemmt, die Hypothese, dass es für seine inhibitorischen Effekte auf CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten spezifisch den Transkriptionsfaktor Eomes verwendet.

#### **4.8.3 CD152 nutzt den Transkriptionsfaktor Eomesodermin für die Regulation von Effektor-Zytokinen in CD8<sup>+</sup> T Zellen**

Für den Nachweis, dass CD152 die Effekte auf die IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen wirklich über den Transkriptionsfaktor Eomes vermittelt, wurden Experimente durchgeführt, in denen CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen retroviral mit einer dominant negativen (DN) und einer Wildtyp (WT) Variante von Eomes transduziert wurden, wodurch dessen Funktion entweder gehemmt oder gefördert wurde. Der verwendete virale Vektor (MigR1) enthält zur Identifizierung positiv transduzierter Zellen das Marker-Gen GFP (engl.: green fluorescent protein). Als Kontrolle für die Effekte der viralen Vektoren auf den Zellmetabolismus wurden CD8<sup>+</sup> T Zellen mit einem Leervektor transduziert, der lediglich das GFP-Gen enthält. TZR transgene CD152<sup>+/+</sup>- und CD152<sup>-/-</sup>-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden 24 h nach der antigenspezifischen Primärstimulation mit den genannten Vektoren retroviral transduziert. 16 h nach Restimulation an Tag 8 wurden die intrazellulären Mengen von IFN- $\gamma$  und Granzym-B bestimmt. Mit dem Leervektor transduzierte CD8<sup>+</sup> T Zellen behielten die differentielle IFN- $\gamma$

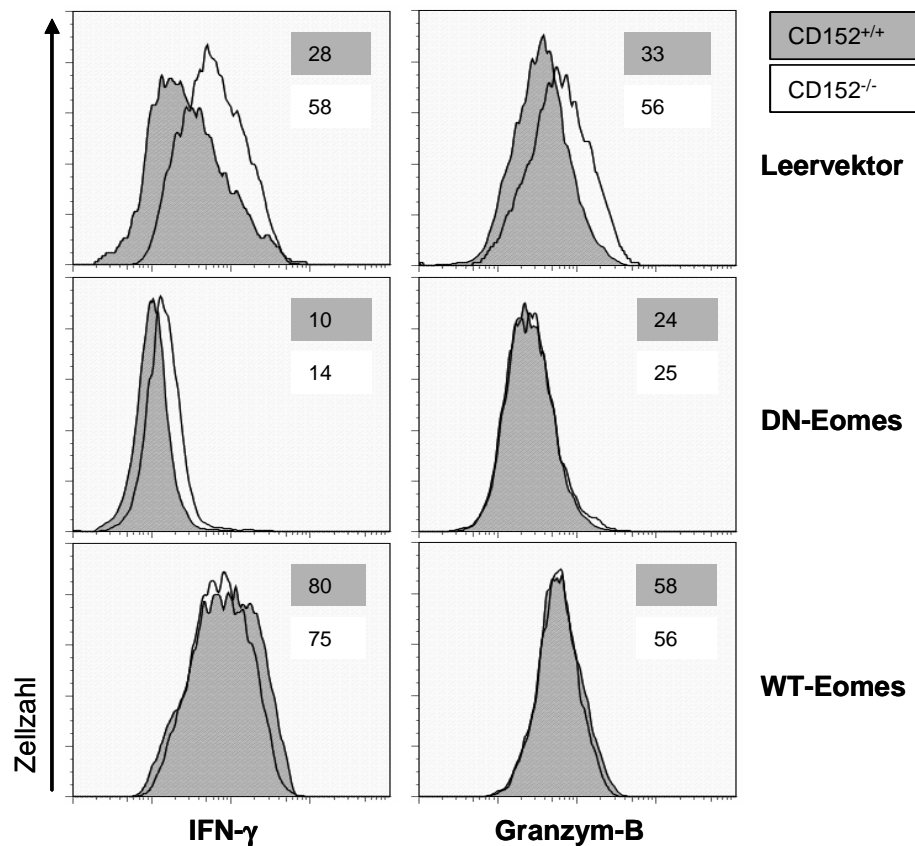
und Granzym-B Expression bei, die auch in nicht transduzierten Zellen beobachtet worden war (**Abbildung 21**). Dabei zeigten CD152 kompetente CD8<sup>+</sup> T Zellen im Vergleich zu CD152 defizienten eine etwa halbierte Effektor-Molekül Produktion. Im Einzelnen lag der geometrische Mittelwert für die IFN- $\gamma$  Produktion in Leervektor-transduzierten CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen bei 58, der für CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen bei 28 (**Abbildung 21**). Der geometrische Mittelwert für die Granzym-B Produktion in CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen bei 56, der für CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen lag bei 33 (**Abbildung 21**).

Die Unterdrückung der Funktion von Eomes durch retrovirale Transduktion des dominant negativen Vektor-Konstrukts reduzierte die intrazellulären IFN- $\gamma$  Mengen auf 14 in CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen und auf 10 in CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen. Die Granzym-B Mengen sanken auf 25 in CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen und 24 in CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 21**). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass es möglich ist, durch die Transduktion von CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen mit einer dominant negativen Eomes-Variante die zuvor differentiellen Produktionen von IFN- $\gamma$  und Granzym-B in diesen Zellen auf einem niedrigen Niveau aneinander anzugleichen.

Zusätzlich führte die Überexpression von WT-Eomes zu einem starken Anstieg der Effektor-Zytokin Produktion in CD152- kompetenten und -defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 21**). Das geometrische Mittel der IFN- $\gamma$  Färbung stieg auf 75 in CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen und auf 80 in CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 21**). Auch die Granzym-B-Mengen gleichen sich auf einem hohen Niveau von 56 in CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen und 58 in CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen an (**Abbildung 21**). Dies zeigt, dass die Eomes-Überexpression in CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen die zuvor differentiellen Produktionen von IFN- $\gamma$  und Granzym-B in diesen Zellen auf einem hohen Niveau aneinander angleichen kann.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass sich die veränderten Effektor-Funktionen in TZR transgenen CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen durch Manipulation der Funktionsweise des Transkriptionsfaktors Eomes stark beeinflussen lassen. Dies deutet darauf hin, dass die CD152 vermittelte Signal-Transduktion spezifisch die Expression von Eomes steuert und dadurch die Hemmung der IFN- $\gamma$  und Granzym-B Produktion unabhängig von T-bet vollzieht.





**Abbildung 21:** CD152 hemmt die Funktion des Transkriptionsfaktors Eomes und bewirkt dadurch die inhibitorischen Effekte auf die IFN- $\gamma$  and Granzym-B Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen. Naive OVA<sub>257-264</sub> spezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> OT1 Mäusen wurden wie in Material und Methoden beschrieben antigenspezifisch primär stimuliert und 24 h später mit Wildtyp (WT) und dominant negativen (DN) Eomes-Varianten retroviral transduziert. Leervektor-transduzierte Zellen dienen als Kontrolle. Die antigenspezifische Restimulation der überlebenden CD8<sup>+</sup> T Zellen wurde an Tag 8 nach initialer Aktivierung durchgeführt. Der Anteil der IFN- $\gamma$  und Granzym-B-produzierenden Zellen wurde in GFP positiven CD152<sup>+/+</sup> (grau schattierte Histogramme) und CD152<sup>-/-</sup> (transparente Histogramme) 16 h nach Restimulation durchflußzytometrisch bestimmt. Die eingetragenen Zahlen geben das geometrische Mittel der Zellzahlen bei den differentiellen Färbungen an. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

## 5 Diskussion

---

Die hier vorgelegte Arbeit weist erstmals nach, dass der Oberflächenrezeptor CD152 Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T Zellen unter Einbeziehung des Transkriptionsfaktors Eomesodermin hemmt. Dies gilt insbesondere für die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$  und Granzym-B sowie für die antigenspezifische Zytotoxizität individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen.

Ausgangspunkt der hier vorgestellten Untersuchungen war der Befund, dass die Oberflächenexpression von CD152 auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T Zellen im Vergleich zu der auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T Zellen drastisch erhöht und verlängert war (**Abbildung 5**) (Pandiyan et al., 2007). Dies ließ auf eine zentrale Funktion von CD152 bei der Steuerung der Immunantworten von CD8<sup>+</sup> T Zellen schließen.

Folgende Effekte von CD152-Signalen auf CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden im Rahmen der hier vorgestellten Experimente untersucht: Hemmung der Produktion von IFN- $\gamma$  und Granzym-B, Hemmung der Zytotoxizität individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen und Einflüsse auf die CD8<sup>+</sup> T-Gedächtnis-Zell-Bildung. Zusätzlich wurden Einflüsse von CD152 auf den intrazellulären Signalweg untersucht, der die genannten Effekte vermittelt.

### 5.1 Die Wirkung von CD152 auf die Effektorzytokin-Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen

#### 5.1.1 CD152 hemmt die IFN- $\gamma$ Produktion individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit demonstrieren zum ersten Mal, dass CD152 bereits während der primären Stimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen die IFN- $\gamma$  Produktion hemmt und dass diese Hemmung individuell und selektiv durch Wirkung auf die IFN- $\gamma^{\text{high}}$  produzierende CD8<sup>+</sup> T Zell Population zustande kommt (Pandiyan et al., 2007). Es ist schon länger bekannt, dass CD152 einen starken inhibitorischen Einfluss auf die Produktion von Effektor-Zytokinen, wie beispielsweise IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ , hat. Frühere Arbeiten hatten jedoch postuliert, dass CD152 die IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen nur nach Restimulation beeinflusst (Chambers et al., 1998).

Neben der inhibitorischen Wirkung von CD152 auf die IFN- $\gamma$  Sekretion von CD8<sup>+</sup> T Zellen, die mittels ELISA nachgewiesen worden war (**Abbildung 9**), konnte auch eine Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen, sowohl nach primärer (**Abbildung 10**), als auch nach sekundärer antigenspezifischer Stimulation gezeigt werden (**Abbildung 13**). Ein IL-2- vermittelter Effekt auf die IFN- $\gamma$  Produktion, der in früheren Publikationen beschrieben worden war (Shrikant et al., 1999), konnte bei diesen Versuchen durch die Zugabe von exogenem IL-2 ausgeschlossen werden.

Zudem wurden die hemmenden Effekte von CD152 auf die Produktion von IFN- $\gamma$ , die bei genetischer Inaktivierung beobachtet worden waren, auch in Versuchen bestätigt, bei denen CD152 serologisch durch die Zugabe von anti-CD152 Fab-Fragmenten blockiert wurde (**Abbildung 11**). Bei diesen Experimenten, die mit CD8<sup>+</sup> T Zellen zweier verschiedener Antigenspezifitäten durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass auch die spezifische Blockade von CD152 sowohl die Sekretion von IFN- $\gamma$  in den Zellkulturüberstand (**Abbildung 11A**), als auch die intrazelluläre IFN- $\gamma$  Produktion (**Abbildung 11B**) hemmt. Da die für diese Versuche verwendeten Zellen sehr stringent auf einen naiven Phänotyp sortiert worden sind (CD44<sup>low</sup>, CD62L<sup>high</sup>), ist dieser Effekt sehr wahrscheinlich nicht auf einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus zurückzuführen. Hinzukommt, dass für diese Versuche nur CD152<sup>-/-</sup> Mäuse, die maximal 6 Wochen alt waren, verwendet wurden. Verschiedene Publikationen haben gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T Zellen aus CD152<sup>-/-</sup> Mäusen in diesem Alter noch in einem naiven Zustand sind (Chambers et al., 1998; Walunas et al., 1994). Hinzu kommt, dass die Analyse des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  keine Unterschiede zwischen CD152-kompetenten und -defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Primärstimulation ergab und damit den vergleichbaren Aktivierungsstatus bestätigt (Pandiyani et al., 2007).

Bei Ko-Kultivierung von CD152<sup>+/+</sup> mit CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen war eine deutliche Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion durch CD152 zu beobachten (**Abbildung 12**). Das bedeutet, dass diese Hemmung unabhängig von exogenen Faktoren oder vom Aktivierungszustand anderer Zellen in den Kulturen reguliert wird. Denn weil IFN- $\gamma$  die Expression vieler weiterer Zytokine steuert (Das et al., 2001; Zhang et al., 2001) und damit ein zentrales proinflammatorisches Schlüsselzytokin in der Immunabwehr darstellt, bestand die Möglichkeit, dass lösliche Faktoren in der Zellkultur die durch CD152 regulierte IFN- $\gamma$  Produktion der CD8<sup>+</sup> T Zellen beeinflussen. Außerdem war nicht sicher vorherzusehen, inwieweit die autokrine Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die CD8<sup>+</sup> T Zellen selbst und insbesondere die parakrine Wirkung auf die APZ

in den Zellkulturen Einfluss auf die CD152 vermittelten Effekte nimmt. Es hätte beispielsweise die Möglichkeit bestanden, dass die verstärkte IFN- $\gamma$  Sekretion der CD8<sup>+</sup> T Zellen in den APZ einen positiven „Feedback-Loop“ induziert und so wiederum die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T Zellen verstärkt (Feurerer et al., 2006). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass CD152 seinen inhibitorischen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen zell-intrinsisch ausübt und somit direkt Einfluss auf die Effektor-Gen-Regulation nehmen muss.

Die Untersuchung IFN- $\gamma$  positiver CD8<sup>+</sup> T Zellen hat gezeigt, dass speziell die Population der IFN- $\gamma^{\text{high}}$  produzierenden Zellen in der CD8<sup>+</sup> Population stark zunahm, wenn CD152 ausgeschaltet war (**Abbildung 10**). Zudem nahm, bei Abwesenheit von CD152, die Geschwindigkeit der IFN- $\gamma$  Induktion nach antigenspezifischer Restimulation drastisch zu (**Abbildung 13**). Ergebnisse aus CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen, die mit anti-CD3 Antikörpern und APZ stimuliert wurden, zeigen dagegen keine differentielle IFN- $\gamma$  Produktion (Pandiyani et al., 2007). Da nur antigenspezifisch stimulierte CD8<sup>+</sup> T Zellen eine CD152 vermittelte Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion zeigen, scheint es, dass die Einflussnahme von CD152 auf die Effektor-Zytokin-Produktion von der Qualität des TZR-Signals abhängt.

Diese Daten demonstrieren, dass CD152 die Produktion des Effektorzytokins IFN- $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T Zellen nicht über die Regulation des Aktivierungs- oder Differenzierungszustandes, sondern direkt über die intrazelluläre Signaltransduktion steuert.

Während der primären Stimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen wird durch CD152 lediglich die Produktion von IFN- $\gamma$ , nicht aber die von TNF- $\alpha$  herunterreguliert, was eine unabhängige Regulation dieser beiden Zytokine durch CD152-Signale bedeutet. Andererseits hemmt CD152 während der sekundären Stimulation die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , was zeigt, dass beide Zytokine durch CD152 reguliert werden können (Pandiyani et al., 2004; Pandiyani et al., 2007).

Auch wenn die TNF- $\alpha$  Produktion nur nach sekundärer Stimulation durch CD152 gehemmt wird, besteht die Möglichkeit, dass dieser Effekt von der Aktivierungsgeschichte der CD8<sup>+</sup> T Zellen und der Menge des während der primären Antwort exprimierten CD152 abhängt. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Hemmung der TNF- $\alpha$  Produktion verglichen mit der von IFN- $\gamma$  nur durch sehr starke Signale vermittelt werden kann. Weil CD152-Signale bekanntermaßen deutlich stärker nach Restimulation auf CD8<sup>+</sup> T Zellen wirken, wäre diese

Argumentation plausibel. Folglich wäre es möglich, dass in einer bestimmten T-Zell-Population nur diejenigen Zellen, die eine große Menge an membranständigem CD152 während der primären Antwort exprimieren, durch CD152-Signale in ihrer TNF- $\alpha$  Produktion gehemmt werden können. Da jedoch die Oberflächenexpression von CD152 nach primärer Stimulation später eintritt als nach sekundärer, die TNF- $\alpha$  Produktion nach beiden Aktivierungen aber schon sehr früh beginnt, könnte die Verzögerung der CD152 Expression nach primärer Stimulation die lediglich nach sekundärer Stimulation gehemmte TNF- $\alpha$  Produktion erklären.

Insgesamt bedeuten diese Ergebnisse, dass CD152 zwei unterschiedliche proinflammatorische Effektor-Zytokine differentiell reguliert und dass die CD152 vermittelte Steuerung von Immunantworten über spezifische intrazelluläre Signaltransduktionswege verläuft.

### **5.1.2 Einfluss von CD152 auf die Heterogenität der CD8<sup>+</sup> T-Effektorzell-Population**

Genetische Inaktivierung von CD152 führte ebenso wie serologische zu einem dramatischen Anstieg der IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zell Kulturen verschiedener Mausstämme. So produzierten z.B. CD8<sup>+</sup> T Zellen aus OT1 Mäusen (antigenspezifisch für das OVA<sub>257-264</sub> Peptid) ebenso wie CD8<sup>+</sup> T Zellen aus P14 Mäusen (antigenspezifisch für das GP33 Peptid) signifikant mehr IFN- $\gamma$  nach antigener Stimulation, wenn CD152 serologisch inaktiviert wurde (**Abbildung 10 & Abbildung 11**). Im Gegensatz dazu zeigten CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen, die mit anti-CD3 Antikörpern und APZ stimuliert wurden, keine differentielle IFN- $\gamma$  Produktion (Pandiyani et al., 2007). Dies deutet auf eine allgemein gültige Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen nach antigenspezifischer Aktivierung über den TZR hin. Warum eine Antigen-unspezifische Stimulation über anti-CD3 Antikörper keine CD152 vermittelte Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion auslöst, bleibt zu klären. Es wäre beispielsweise denkbar, dass Faktoren, die durch die Signalkaskade von CD152 beeinflusst werden, wie z.B. die PI3K (Wei et al., 2007), direkt an die zytoplasmatische Seite des TZR binden und nicht an den CD3-Komplex. Auf diese Weise könnten Aktivierungssignale, die über den CD3-Komplex vermittelt werden, den hemmenden Einfluss von CD152 umgehen.

Interessanterweise, ergab die intrazelluläre Analyse antigenspezifisch stimulierter CD8<sup>+</sup> T Zellen, dass fast alle Zellen beider Kulturen IFN- $\gamma$  Produzenten waren. Lediglich die IFN $\gamma$ <sup>high</sup> produzierende Teilpopulation war durch die CD152 Signale in ihrer Produktion signifikant

gehemmt (**Abbildung 10 & Abbildung 11**). Dieses Ergebnis deutet auf eine spezifische Wirkung von CD152 auf solche CD8<sup>+</sup> T Zellen hin, die einen starken Stimulus erhielten, und könnte durch die unterschiedlich starke Oberflächenexpression die große Heterogenität der T Zell Populationen beeinflussen (Maszyzna et al., 2003). Die Daten der hier vorgelegten Arbeit unterstützen die Hypothese, dass bevorzugt T Zellen, die einen starken Stimulus erhalten haben, membranständiges CD152 exprimieren (Egen and Allison, 2002). Auf diese Weise werden speziell solche T Zellen in ihrer Immunantwort gehemmt, die eine hohe Affinität zu einem dominanten Epitop des Erregers besitzen. Dieser Mechanismus könnte die Funktion erfüllen, dass sich auch T Zellen, die weniger affine subdominante Epitope des Pathogens erkennen, vermehren können und dadurch die Heterogenität der Immunantwort aufrecht erhalten wird (Egen and Allison, 2002).

Es wäre auch denkbar, dass durch die selektive Hemmung dominanter CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten auch die Entstehung des T-Zell-Gedächtnisses beeinflusst wird. CD8<sup>+</sup> T Zellen, die dominante Epitope eines Pathogens erkennen und dadurch effektiv vor einer Infektion dieses Erregers schützen können, könnten durch eine von CD152 vermittelte gezielte Hemmung ihrer starken Immunantwort vor einem Erschöpfungszustand und dem darauf folgenden aktivierungsinduzierten Zelltod schützen.

## **5.2 CD152 vermittelte Effekte auf die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T Zellen**

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigen, dass CD152 nicht nur ein zentraler Regulator der Effektorzytokin-Produktion ist, sondern auch, dass es einen direkten inhibitorischen Einfluss auf die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T Zellen hat (**Abbildung 16**). Frühere Studien haben gezeigt, dass CD152 die Zytotoxizität lediglich durch Reduktion der Proliferation, das heißt, durch eine Verringerung der Anzahl zytotoxischer Effektor-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Organismus hemmt (Gajewski et al., 2001; Shrikant et al., 1999; Bachmann et al., 1998). Die im Folgenden beschriebenen Unterschiede in dem experimentellen Versuchsaufbau könnten für diese abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein. Shrikant et al. haben bei der Untersuchung CD152 defizienter CD8<sup>+</sup> T Zellen in einem Tumormodell in Mäusen einen selektiven Anstieg der Effektor-Zellzahl in der Region des Tumors und eine effizientere lokale Abstoßung beobachtet (Shrikant et al., 1999). Für die Versuche der hier vorliegenden Arbeit wurden dagegen Antigen-beladene Zielzellen direkt i.v. injiziert und

damit eine systemische Immunantwort hervorgerufen. Diese experimentelle Versuchsanordnung erschwert die Lokalisation der reagierenden CD8<sup>+</sup> T Zellen, da in diesem Modell keine drainierenden Lymphknoten eines Entzündungsherdes untersucht werden können. Als repräsentative Organe des gesamten Immunsystems wurden deshalb die Milz und die inguinalen und axillaren Lymphknoten vereinigt und der Prozentsatz an OVA<sub>257-264</sub> Peptid antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen bestimmt. Die Analyse dieser Organe ergab keine signifikanten Unterschiede der Zellhäufigkeit antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T Zellen in den beiden Empfängertier-Gruppen (**Abbildung 16B, rechts**).

Auch die systemische antivirale Immunantwort CD152 defizienter CD8<sup>+</sup> T Zellen wurde in einem Mausmodell durch Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) untersucht und ergab lediglich aufgrund verstärkter Proliferation einen prozentualen Anstieg der CD152<sup>-/-</sup> im Vergleich zu den CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (Bachmann et al., 1998). Im Gegensatz zu der experimentellen Verfahrensweise der hier vorgelegten Arbeit wurden allerdings nicht FACS-sortierte naive CD8<sup>+</sup> T Zellen mit einem CD44<sup>low</sup> und CD62L<sup>high</sup> Phänotyp (**Abbildung 6**), sondern komplette unsortierte Milzzellen verwendet, sodass CD8<sup>+</sup> T Zellen mit nicht einheitlichem Aktivierungszustand adoptiv transferiert wurden. Diese Versuchsanordnung schließt deshalb die erhöhte und schnellere Proliferationsneigung bereits voraktivierter T Zellen nicht aus und kann somit den eigentlichen CD152 vermittelten hemmenden Effekt, der während der initialen T-Zell-Aktivierung ausgeübt wird, nicht eindeutig aufklären.

Obwohl CD152 offenkundig einen signifikanten inhibitorischen Einfluss auf die Produktion verschiedener Effektor-Moleküle besitzt, einschließlich Granzym-B (**Abbildung 15**), welches ein zentraler Faktor der zytotoxischen Signalkaskade ist, konnte überraschenderweise bis heute keine Hemmung der Zytotoxizität individueller T Zellen beobachtet werden. Auf den ersten Blick bestätigten Daten dieser Arbeit diese Ergebnisse, da sowohl CD152<sup>+/+</sup> wie auch CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen in der Lage waren, für lange Zeit in vivo zu persistieren und effizient antigenspezifische zytotoxische Effektorfunktionen auszuüben (**Abbildung 18B**). Zunächst durchgeführte Etablierungsexperimente, bei denen die Zielzell-Inkubation über 6 h lag, zeigten eine vergleichbare Zytotoxizität von CD152-kompetenten sowie -defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen und deuteten darauf hin, dass durch CD152 keine Hemmung der Zytotoxizität bewirkt wird (**Abbildung 18B**). Erst durch eine Verkürzung der Inkubationszeit des in vivo-Zytotoxizitäts-Tests auf  $\leq 4$  h konnte die gesteigerte Zelllyse der

CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen aufgedeckt werden. Weil die Interaktion der CD8<sup>+</sup> T Zellen mit ihren Zielzellen enorm schnell verläuft, wurde erst durch die Verkürzung der Inkubationszeit in vivo das Beobachtungsfenster dieser Methode richtig gewählt. Da der Test in vivo mit kongenen Milzzellen durchgeführt wird, repräsentiert er außerdem eine physiologische Versuchsanordnung. Auch stellt die Bestimmung des Prozentsatzes antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T Zellen mittels der MHC-I-Tetramerfärbung eine zuverlässige Methode zur Erfassung sämtlicher für dieses Antigen spezifischer Effektor-Zellen dar (Altman et al., 1996).

Die gesammelten Daten demonstrieren eine signifikante CD152 vermittelte Hemmung der Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 16**). Die hier ermittelte Zunahme der systemischen Zytotoxizität CD152 defizienter CD8<sup>+</sup> T Zellen mit Hilfe der gezielten Modulation der Immunantwort von Effektor-T-Zellen stellt viel versprechende Anwendungsmöglichkeiten für die Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten in Aussicht. Durch gezielte und zeitlich begrenzte Blockade, bzw. Inaktivierung, von CD152 in vivo könnte, beispielsweise in Kombination mit der Verabreichung eines Impfstoffes, die zytotoxische Immunantwort gegenüber ausgewählten Virus- oder Tumor-Antigenen entscheidend verstärkt werden. Andererseits wäre auch denkbar, durch CD152-Agonisten ungewollte zytotoxische Reaktionen von CD8<sup>+</sup> T Zellen im Verlauf von Autoimmun-Erkrankungen zu mildern.

### 5.3 Mögliche Wirkung von CD152 auf das T Zell Gedächtnis

Die langfristigen in vivo Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass beide, CD152-kompetente und CD152-defiziente CD8<sup>+</sup> T Zellen in der Lage sind, in vollwertige Gedächtniszellen zu differenzieren. Dabei ist sowohl das für CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen typische Expressionsmuster der Oberflächenrezeptoren (**Abbildung 17**), als auch die Funktionalität der Effektorfunktionen nachgewiesen worden (**Abbildung 18**).

Es war zu berücksichtigen, dass die frühe Expression von CD152 auch auf spätere Differenzierungsschritte wirken könnte, sodass die Differenzierung der Zellen durch ihre Aktivierungsgeschichte beeinflusst würde. Hinweise, dass, zumindest in manchen Differenzierungsmodellen, die T-Gedächtnis-Zell-Bildung stark von der initialen Aktivierung und den ausgeübten Effektor-Funktionen abhängt, finden sich in der Literatur (Gett et al., 2003; Opferman et al., 1999). Auch eine Einflussnahme auf die Art der entstehenden CD8<sup>+</sup> T-Gedächtnis-Zellen war denkbar. So könnte beispielsweise durch langfristige Hemmung der



IFN- $\gamma$  Produktion und proapoptotischer Faktoren durch CD152 die Entstehung von zentralen CD8<sup>+</sup> T Gedächtnis-Zellen gefördert werden (Mescher et al., 2006; Northrop and Shen, 2004; Refaeli et al., 2002). Da in CD4<sup>+</sup> T Zellen bereits ein durch Einbeziehung von Bcl-2 vermittelter antiapoptotischer Effekt der CD152 Expression nachgewiesen wurde (Pandiyana et al., 2004), war dies auch für CD8<sup>+</sup> T Zellen denkbar.

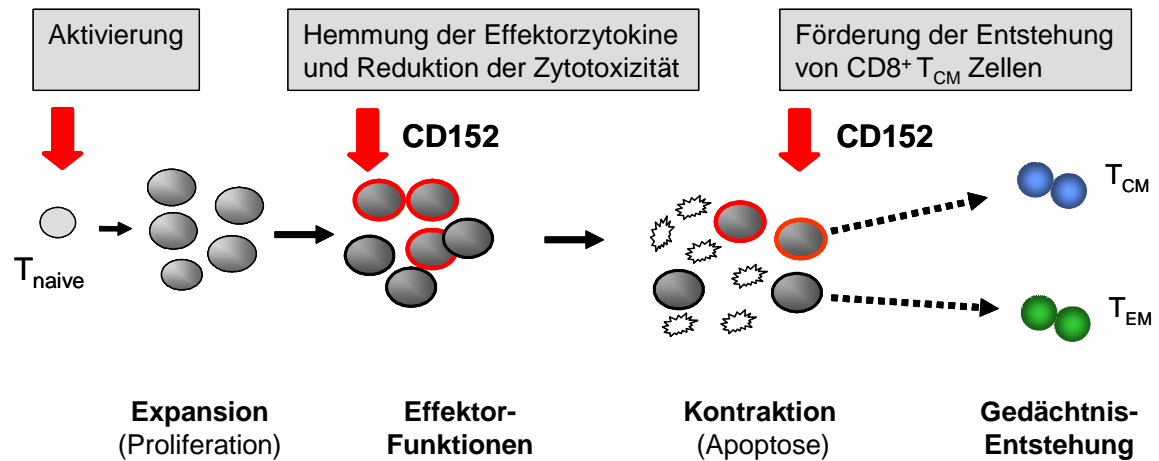
Es gibt einige Indizien, dass CD152 Oberflächen-positive T Zellen wegen ihrer Expression hochaffiner TZR und einer geringeren Apoptoseeigung am meisten zu einer effektiven Immunantwort beitragen, und dass sie nach der Beseitigung des Pathogens unter der Wirkung von CD152-Signalen zu Gedächtniszellen differenzieren (Hayashi et al., 2002; Wu et al., 2002; Gett et al., 2003). Außerdem existieren Studien, die zeigen, dass T Zellen, die während einer Immunantwort geringere Mengen an IFN- $\gamma$  produzieren, später durch Vermeidung des aktivierungsinduzierten Zelltodes (AICD) im Vergleich zu IFN- $\gamma^{\text{high}}$  Produzenten eine größere Chance haben, in lang lebende Gedächtniszellen zu differenzieren (Refaeli et al., 2002). Der in unserer Arbeitsgruppe entdeckte antiapoptotische Effekt von CD152 in CD4<sup>+</sup> T Zellen war von der verstärkten Expression des Faktors Bcl-2 abhängig (Pandiyana et al., 2004). Da Bcl-2 auch ein zentraler Faktor für die Entstehung von Gedächtniszellen ist, könnte dies einen weiteren Signalweg darstellen, der zur T-Gedächtniszellentstehung beiträgt. Alle diese Ergebnisse, die zu einem großen Teil experimentell in CD4<sup>+</sup> T Zellen untersucht wurden, weisen auf eine wichtige Rolle von CD152 auf die CD8<sup>+</sup> T Zell Gedächtnisentstehung hin.

Ungeachtet dessen zeigten adoptiv transferierte CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen nach 80 Tagen in vivo in einigen Experimenten eine geringere Oberflächenexpression des Rezeptors CD62L. Dieser ist notwendig für die Migration von Lymphozyten in lymphatische Gewebe und zudem ein charakteristischer Oberflächenrezeptor von T<sub>CM</sub> Zellen (Janeway et al., 2005; Roberts et al., 2005). Besonders Zellen, die in die Milz oder die Lunge migrierten, wiesen eine geringere Expression von CD62L auf (**Abbildung 17B**). Gleichzeitig war die Anzahl der CD152 defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen, die nach ex vivo Restimulation große Mengen IFN- $\gamma$  produzierten, in diesen Organen erhöht (**Abbildung 18A**). Während die Lunge ein typisches peripheres nicht lymphatisches Organ darstellt, vereinigt die Milz Eigenschaften eines sekundären lymphatischen Organs mit denen eines nicht lymphatischen (Janeway et al., 2005). Da sich CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> Zellen (CD62L<sup>low</sup>) bevorzugt in peripheren Geweben aufhalten, so dass sie schnell auf eindringende Pathogene reagieren können (Masopust et al., 2001), ist es nicht überraschend, dass sich ausgerechnet CD8<sup>+</sup> T Zellen dieses Phänotyps dort ansammeln.

Inwieweit dies allerdings Einfluss auf die Immunantwort der T-Gedächtniszellen in vivo hat, konnte durch die hier durchgeführten Versuche nicht eindeutig geklärt werden. Nachgewiesen wurde zumindest eine effektive systemische zytotoxische Immunantwort sowohl der CD152<sup>-/-</sup> wie auch der CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen, wie die Daten des in vivo Zytotoxizitäts-Tests zeigen (**Abbildung 18B**). Dies könnte bedeuten, dass CD152 die Entstehung von T<sub>CM</sub> (CD62L<sup>high</sup>) Zellen fördert. Für eine genauere Analyse der Schnelligkeit der Immunantwort sollte in zukünftigen Experimenten die Inkubationszeit des Zytotoxizitäts-Tests in den lang andauernden in vivo Versuchen von 8 h auf etwa 4 h reduziert werden. Für die Untersuchung der IFN- $\gamma$  Produktion sollte auch die ex vivo Restimulationsdauer variiert werden (**Abbildung 18A**).

Gegen eine Förderung der Bildung von CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> durch CD152-Signale spricht, dass die Untersuchung der für die T-Gedächtniszell-Differenzierung typischen Aktivierungsmarker wie CD44, CD62L, CD25, CD122 und CD127 keine bemerkenswerten Unterschiede in der Oberflächenexpression zwischen CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen vor (0 h) und nach antigenspezifischer Restimulation (24 h) ergab (**Abbildung 14**). Dies deutet darauf hin, dass sich die Zellen in einem ähnlichen Differenzierungsstadium sowohl nach primärer- als auch während der ersten Stunden nach sekundärer Aktivierung befanden. Die Tatsache, dass CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen nach antigenspezifischer Restimulation ex vivo eine viel schnellere Effektor-Zytokin-Produktion zeigen als CD152<sup>+/+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (**Abbildung 13**), unterstützt die Annahme, dass CD152 die T-Gedächtniszell-Entwicklung derart beeinflusst, dass eher die Entstehung von T<sub>CM</sub> als die Entstehung von T<sub>EM</sub> gefördert wird. Allerdings muß hier erwähnt werden, dass bei diesem Versuch die Restimulation schon an Tag 8 nach initialer Aktivierung erfolgte und somit nicht wirklich eine Immunantwort später T-Gedächtniszellen repräsentiert. Eine bevorzugte Bildung von CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> Zellen könnte damit begründet werden, dass in diesen Zellen die Effektor-Gene überwiegend demethyliert sind und deshalb die für die entsprechenden Effektor-Moleküle spezifische mRNA in höheren Konzentrationen vorliegt, sodass die Reaktion auf Pathogene schneller erfolgen kann (Aune et al., 1997). Der Einfluss von CD152 auf die Gedächtnis-Entstehung könnte dann durch Hemmung der Gen-Demethylierung und -Transkription erklärt werden.

In **Abbildung 22** ist ein Modell dargestellt, dass die Effekte von CD152-Signalen auf die CD8<sup>+</sup>-T-Gedächtnis-Zell-Differenzierung zusammenfasst. Ergebnisse dieser Arbeit haben einen hemmenden Einfluss von CD152 auf die Effektor-Molekül Produktion und auf die



**Abbildung 22:** Modell der Einflussnahme von CD152 bei primärer Stimulation auf die Entstehung des  $CD8^+$  T-Zell-Gedächtnisses. Nachdem naive  $CD8^+$  T Zellen einen antigenspezifischen Stimulus erhalten haben, expandieren sie und beginnen membranständiges CD152 (rote Umrandung) zu exprimieren. In der darauf folgenden Effektorphase der Immunantwort hemmt CD152 die Produktion entscheidender Effektor-Zytokine, wie z.B.  $IFN-\gamma$ . Außerdem konnte ein inhibitorischer Einfluss auf die Zytotoxizität von  $CD8^+$  T Zellen nachgewiesen werden. Nach Beseitigung des Pathogens stirbt während der Kontraktion ein Großteil der Effektorpopulation durch Apoptose und beendet dadurch die akute Effektorphase. Die überlebenden T Zellen differenzieren in die beiden Gedächtniszell-Subpopulationen  $T_{CM}$  (blau) und  $T_{EM}$  (grün).

Zytotoxizität von  $CD8^+$  T Zellen gezeigt. Die Kontraktion der Effektorzell-Population durch Apoptose scheint dabei nicht sonderlich beeinflusst zu werden. Bei der Gedächtnis-Zell-Entstehung könnte CD152 allerdings Einfluss auf die Art der entstehenden Gedächtnis-Population nehmen, indem es z.B. die Bildung von  $T_{CM}$  (Abbildung 22, blau) unterstützt und die von  $T_{EM}$  (grün) hemmt.

Um dies in weiterführenden Versuchen zu klären, sollte die Expression typischer T-Gedächtnis-Zell Oberflächenmarker, insbesondere in lang andauernden in vivo Experimenten, genauer untersucht werden. Zusätzlich würde die Analyse der Effektor-Funktionen solcher  $CD8^+$  T-Gedächtnis-Zellen durch Einsatz eines Zytotoxizitäts-Tests interessante Einsichten liefern. Durch Variation der Inkubationszeit des Tests könnte diese Methode außerdem gezielt auf diese Fragestellung abgestimmt werden. Zusätzlich könnte die Erforschung der Fähigkeit von  $CD8^+$  T Zellen aus verschiedenen Organen, ex vivo Effektor-Moleküle, wie z.B.  $IFN-\gamma$  oder Granzym-B, zu produzieren, weitere Erkenntnisse über den Einfluss von CD152 auf die späte Differenzierung liefern.

Zusammengenommen zeigen die in dieser Arbeit experimentell erhobenen Ergebnisse, dass CD152 weder die Bildung eines phänotypischen noch eines funktionellen  $CD8^+$  T-Zell-Gedächtnisses verhindert oder signifikant beeinflusst. Allerdings wurden kleine Unterschiede

in der Expression des Aktivierungsmarkers CD62L und in der Populationsgröße IFN- $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup> T Zellen entdeckt, die auf einen gewissen Einfluss von CD152-Signalen hindeuten.

## 5.4 Hemmender Einfluss von CD152 auf intrazelluläre Signalwege in CD8<sup>+</sup> T Zellen

### 5.4.1 CD152 inhibiert die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK

Die Regulation der Effektor-Funktionen in T Zellen ist zu einem großen Teil von dem Aktivierungszustand von Mitgliedern der mitogenaktivierten Proteinkinase-Familie (MAPK) abhängig (Rincon et al., 2000). Durch die Phosphorylierung der MAPK-assoziierten Kinasen ERK (engl.: extracellular signal-regulated kinase) und JNK (engl.: c-Jun N-terminal kinase) werden stimulatorische Signale des TZR und kostimulatorische Signale von CD28 in das Zytoplasma und die intrazellulären Signalwege von CD8<sup>+</sup> T Zellen weitergeleitet. Weitere für die hemmende Wirkung von CD152 in Frage kommende Faktoren sind auch PI3K, SHP-2 und PP2A. So wurde bereits publiziert, dass der intrazelluläre Teil von CD152 sich mit der PI3K (Schneider et al., 1995), mit SHP-2 (Marengere et al., 1996) und mit PP2A (Chuang et al., 2000) assoziiert. Welche dieser Proteine hierbei eine vorherrschende Rolle bei der Vermittlung der Signale spielen, ist bisher noch unklar und muß in weiteren Studien untersucht werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde im Unterschied zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Calvo et al., 1997; Schneider et al., 2002) die Phosphorylierung von ERK in CD152-kompetenten und -defizienten CD8<sup>+</sup> T Zellen 0 h, 16 h, 20 h, und 24 h nach antigenspezifischer Restimulation untersucht. Diese Ergebnisse erweitern damit die bisherigen Daten insofern, als sie zeigen, dass auch nach antigenspezifischer Restimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen die Phosphorylierung von ERK durch CD152 vermittelte Signalwege gehemmt wird (**Abbildung 19A**). Die nahezu vollkommen abgeschaltete IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Inkubation mit dem ERK-Inhibitor UO126 (**Abbildung 19B**) verdeutlicht die zentrale regulatorische Rolle dieses Signalwegs für die Effektor-Zytokin Produktion. Dass sich aber die Zytokin-Produktion sowohl CD152-kompetenter als auch -defizienter CD8<sup>+</sup> T Zellen durch die Zugabe dieses Inhibitors in gleichem Masse reduzierte,

bestätigt die zentrale Rolle dieses Signalwegs auch bei der CD152 vermittelten Hemmung der Effektor-Molekül Produktion.

Der hemmende Einfluss von CD152 auf die Phosphorylierung von Mitgliedern der MAPK-Familie, speziell auf die MAPK-assoziierte Kinase ERK, ist bereits gezeigt worden (Calvo et al., 1997; Schneider et al., 2002). Im Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurden in den zitierten Studien jedoch die Effekte von CD152-Signalen entweder an CD4<sup>+</sup> T Zellen (Schneider et al., 2002) oder an unspezifisch polyklonal stimulierten CD8<sup>+</sup> T Zellen (Calvo et al., 1997) untersucht. Eine Beeinflussung der Phosphorylierung weiterer für die T Zell Stimulation wichtiger Faktoren durch CD152-Signale, wie z.B. ZAP-70 (engl.: zeta-chain-associated protein kinase 70) oder der TZR- $\zeta$  Kette, konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Calvo et al., 1997).

#### 5.4.2 Selektive Hemmung der Expression von Eomesodermin

In Kapitel 1.6 ist beschrieben worden, dass die transkriptionelle Regulation der Effektor-Zytokin Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen vorwiegend durch zwei T-box Transkriptionsfaktoren namens T-bet und Eomesodermin (Eomes) gesteuert wird (Glimcher et al., 2004; Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2003; Townsend et al., 2004). Inwieweit CD152 sich dieser Signalwege bedient, war bisher jedoch unklar. Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit demonstrieren nun zum ersten Mal, dass CD152 seine inhibitorischen Eigenschaften auf die Effektor-Zytokin-Produktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen über die selektive Hemmung des Transkriptionsfaktors Eomesodermin ausübt.

In den hier vorgestellten Experimenten wurden die mRNA- und Protein-Mengen von Eomes und T-bet in CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine eindeutige und selektive Hemmung sowohl der Gen-Transkription (**Abbildung 20B**) als auch der -Translation (**Abbildung 20C**) des Transkriptionsfaktor Eomes. Die T-bet Expression wird durch die CD152 Signalkaskade nicht beeinflusst. Welche intrazellulären Mediatoren das Signal vom CD152 Oberflächenrezeptor-Molekül auf die Gen-Expression von Eomes übertragen, lässt sich allerdings anhand der bisher durchgeführten Experimente nicht endgültig klären. Gesichert scheint eine Beteiligung der MAP-Kinase ERK zu sein, da deren selektive Blockade während der antigenspezifischen TZR-Stimulation die IFN- $\gamma$  Produktion sowohl in CD152<sup>+/+</sup> als auch in CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen auf ein Minimum reduzierte (**Abbildung 19B**).

Auch die retrovirale Transduktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen mit dominant negativen und Wildtyp-Eomes-Vektorkonstrukten demonstrierte, dass CD152 die Effektor-Molekül-Produktion durch Verringerung der Eomes-Aktivität hemmt (**Abbildung 21**). Diese Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll die Möglichkeit, die unterschiedliche Produktionsrate von IFN- $\gamma$  und Granzym-B von CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen mit Hilfe der Modulation der Eomes-Aktivität auf einem entweder niedrigen (dominant negativ) oder hohen (Wildtyp) Niveau zu synchronisieren. Vor kurzem wurde zudem publiziert, dass Eomes auch in CD4<sup>+</sup> T Zellen exprimiert wird und dort einen IL-21 abhängigen, aber T-bet unabhängigen inhibitorischen Effekt auf die IFN- $\gamma$  Produktion ausübt (Suto et al., 2006). Dies könnte ein Hinweis auf regulatorische Mechanismen von Eomes auch in CD8<sup>+</sup> T Zellen sein und sollte daher weiter untersucht werden.

Zusammengefasst zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse, dass die transkriptionelle Steuerung der Effektor-Zytokin-Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen durch zwei getrennte Signalwege reguliert wird. CD152 Signale hemmen spezifisch die Expression von Eomes und nicht die von T-bet. Die Reduktion der Konzentration dieses Transkriptionsfaktors hat direkte Auswirkungen auf die Transkription der Effektor-Moleküle in CD8<sup>+</sup> T Zellen, wie z.B. der von IFN- $\gamma$  und Granzym-B. Eine geringere Sekretion dieser Zytokine führt dann zu einer abgeschwächten Immunantwort und Zytotoxizität. Ob weitere parallel agierende inhibitorische Signalwege existieren, die durch die Bindung an CD152 aktiviert werden, muss in weiteren Experimenten aufgeklärt werden.

## 5.5 Ausblick

Für die weitere Untersuchung der durch CD152 vermittelten Einflüsse auf die Effektor-Funktionen von CD8<sup>+</sup> T Zellen und die Signalwege, die es dafür nutzt, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an: Der bei frühen Immunantworten bereits demonstrierte hemmende Effekt von CD152 auf die Zytotoxizität könnte auch bei späten Immunreaktionen von bereits lange Zeit in vivo persistierenden Zellen nachgewiesen werden, indem die Geschwindigkeit der Immunantworten von CD152<sup>+/+</sup> und CD152<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Gedächtnis-Zellen mit Hilfe eines für die Inkubationszeit optimierten in vivo Zytotoxizitäts-Tests untersucht wird. Für eine genauere Analyse der Einflüsse von CD152 auf die IFN- $\gamma$  Produktion sollte zudem die ex vivo Restimulationsdauer der CD8<sup>+</sup> T-Gedächtnis-Zellen in weiterführenden Experimenten variiert werden.

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors Eomes bei der Entstehung eines langfristig bestehenden CD8<sup>+</sup> T-Zell-Gedächtnisses zu untersuchen, wären beispielsweise Experimente zweckmäßig, in denen die Entwicklung retroviral transduzierter CD8<sup>+</sup> T-Effektor-Zellen in vivo durch adoptiven Transfer in kongene Mäuse über einen längeren Zeitraum verfolgt wird. Die Funktion von Eomes könnte dabei mit WT-Eomes und DN-Eomes Vektorkonstrukten gezielt an-, bzw. ausgeschaltet werden und so Aufschluss darüber geben, ob Eomes für die Kontraktion der Effektorpopulation nach der Beseitigung des Pathogens und die T-Gedächtniszell-Differenzierung notwendig ist. Interessant wäre zudem die Erforschung des Einfluss von Eomes auf die Effektor-Molekül Produktion derartig transduzierter Zellen. Es wäre z.B. denkbar, dass bei einer spät erfolgenden Immunantwort der CD8<sup>+</sup> T Zellen andere Transkriptionsfaktoren, wie etwa T-bet oder NFAT, die Funktion von Eomes kompensieren können. Ein weiterer interessanter Transkriptionsfaktor, bei dem vor kurzem ein hemmender Einfluss auf die zytotoxischen Eigenschaften von CD8<sup>+</sup> T Zellen entdeckt wurde und der deshalb aufschlussreich bei weiterführenden Versuchen mit simultaner Beeinflussung von CD152 sein könnte, ist cKrox (Jenkinson et al., 2007). Bei solchen Experimenten könnten durch den Einsatz verschiedener Stimulationsweisen variierende T-Zell-Antworten ausgelöst und untersucht werden, was wiederum darüber Aufschluß geben könnte, ob CD152 bei der Steuerung von Immunantworten mehrere Signalwege verwendet und wie diese interagieren. Wie kürzlich veröffentlicht wurde, spielt IL-21 bei der T-bet unabhängigen Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion in CD4<sup>+</sup> T Zellen eine entscheidende Rolle (Suto et al., 2006). Daten dieser Arbeit zeigen, dass die CD152 vermittelte Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen

---

ebenfalls T-bet-unabhängig gesteuert werden kann. Dies legt eine genauere Untersuchung des Einflusses von IL-21 auf CD8<sup>+</sup> T Zellen nahe.





## 6 Zusammenfassung

---

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD152 die Produktion der Effektormoleküle IFN- $\gamma$  und Granzym-B nach antigenspezifischer primärer sowie sekundärer Stimulation entscheidend herunterreguliert. Interessanterweise konnte zudem erstmals nachgewiesen werden, dass CD152 auch die frühe Zytotoxizität individueller CD8<sup>+</sup> T Zellen in vivo hemmt. Desweiteren ergab die Analyse der CD152 vermittelten Gen-Regulation wichtige Erkenntnisse darüber, wie CD152 verschiedene Effektor-Funktionen in CD8<sup>+</sup> T Zellen differenziell beeinflusst. Es konnte nachgewiesen werden, dass CD152 seine inhibitorischen Effekte durch die selektive Hemmung der Akkumulation von Eomesodermin mRNA ausübt und dadurch die Effektor-Molekül Produktion in CD8<sup>+</sup> T Zellen reguliert. Dieser Einfluss lag innerhalb der Hierarchie der intrazellulären Signalkaskade proximal des ERK/MAPK Signalwegs und gibt zum ersten Mal Aufschluss darüber, dass CD152 die Immunantworten in T Zellen auf transkriptioneller Ebene steuert.

Ein besseres Verständnis der Mechanismen, derer sich CD152 für die Steuerung von Immunantworten von CD8<sup>+</sup> T Zellen bedient, ist für die Entwicklung neuer Therapien, einschließlich solcher, die sich bereits in klinischen Studien befinden, von großer Bedeutung. Die gegenwärtig in klinischen Studien untersuchten Therapien, welche durch CD152 Signale beeinflusst werden, beschränken sich zum einen auf den Einsatz des CTLA4-Ig-Fusionsproteins, das gezielt den Schwellenwert, der für eine Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen nötig ist, anhebt, und zum anderen auf die Verabreichung von CD152-blockierenden Antikörpern und Fab-Fragmenten, die den Schwellenwert für eine Aktivierung herabsetzen. Hierdurch können entweder chronische Entzündungen und autoimmune Reaktionen gegen autologe Strukturen des Organismus, wie sie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis oder der multiplen Sklerose auftreten, verhindert werden, oder umgekehrt CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten gegen bestimmte pathogene Antigene verstärkt werden. Dies ist z.B. bei der Behandlung von metastasierenden Tumoren, aber auch bei der Bekämpfung chronischer viraler Infektionen von großem Vorteil.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit erweitern das Verständnis der Wirkungsweise dieser Therapievarianten auf CD8<sup>+</sup> T Zellen und tragen so dazu bei, den Einsatz dieser Behandlungen zielgenauer zu machen und Nebenwirkungen zu minimieren. Aufgrund der

hier präsentierten Daten über die von CD152 genutzte intrazelluläre Signalkaskade des ERK/MAPK-Signalwegs und der Akkumulation von Eomesodermin mRNA im Nukleus ergeben sich des weiteren neue mögliche Ansatzpunkte für den Einsatz von Pharmazeutika, die gezielt in diesen Signalweg eingreifen. Das könnte neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen, wie z.B. die Wirkungsstärke des Transkriptionsfaktors Eomesodermin je nach Bedarf der Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T Zellen unter Bezug auf die jeweils zu behandelnde Krankheit zu modulieren.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

---

- Abbas,A.K., Murphy,K.M., and Sher,A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383, 787-793.
- Alegre,M.L., Frauwirth,K.A., and Thompson,C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 220-228.
- Alegre,M.L., Noel,P.J., Eisfelder,B.J., Chuang,E., Clark,R., Reiner,S.L., and Thompson,C.B. (1996). Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on mouse T cells. *J. Immunol.* 157, 4762.
- Altman,J.D., Moss,P.A., Goulder,P.J., Barouch,D.H., Heyzer-Williams,M.G., Bell,J.I., McMichael,A.J., and Davis,M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 274, 94-96.
- Arai,K., Yamamura,S., Seki,S., Hanyu,T., Takahashi,H.E., and Abo,T. (1998). Increase of CD57+ T cells in knee joints and adjacent bone marrow of rheumatoid arthritis (RA) patients: implication for an anti-inflammatory role. *Clin. Exp. Immunol.* 111, 345-352.
- Attia,P., Phan,G.Q., Maker,A.V., Robinson,M.R., Quezado,M.M., Yang,J.C., Sherry,R.M., Topalian,S.L., Kammula,U.S., Royal,R.E., Restifo,N.P., Haworth,L.R., Levy,C., Mavroukakis,S.A., Nichol,G., Yellin,M.J., and Rosenberg,S.A. (2005). Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J. Clin. Oncol.* 23, 6043-6053.
- Aune,T.M., Penix,L.A., Rincon,M.R., and Flavell,R.A. (1997). Differential transcription directed by discrete gamma interferon promoter elements in naive and memory (effector) CD4 T cells and CD8 T cells. *Mol. Cell Biol.* 17, 199-208.
- Bachmann,M.F., Barner,M., Viola,A., and Kopf,M. (1999). Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur. J. Immunol.* 29, 291-299.
- Bachmann,M.F., Gallimore,A., Jones,E., Ecabert,B., Acha-Orbea,H., and Kopf,M. (2001). Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered. *Eur. J. Immunol.* 31, 450-458.
- Bachmann,M.F., Waterhouse,P., Speiser,D.E., McKall-Faienza,K., Mak,T.W., and Ohashi,P.S. (1998). Normal responsiveness of CTLA-4-deficient anti-viral cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 160, 95-100.
- Baran,K., Ciccone,A., Peters,C., Yagita,H., Bird,P.I., Villadangos,J.A., and Trapani,J.A. (2006). Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. *J. Biol. Chem.* 281, 30485-30491.
- Bentley,G.A. and Mariuzza,R.A. (1996). The structure of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 14:563-90., 563-590.

Berner,B., Akca,D., Jung,T., Muller,G.A., and Reuss-Borst,M.A. (2000). Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J. Rheumatol.* 27, 1128-1135.

Bonifaz,L.C., Bonnyay,D.P., Charalambous,A., Darguste,D.I., Fujii,S., Soares,H., Brimnes,M.K., Moltedo,B., Moran,T.M., and Steinman,R.M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 199, 815-824.

Bossie,A. and Vitetta,E.S. (1991). Ifn-Gamma Enhances Secretion of Igg2A from Igg2A-Committed Lps-Stimulated Murine B-Cells - Implications for the Role of Ifn-Gamma in Class Switching. *Cellular Immunology* 135, 95-104.

Brunner,M.C., Chambers,C.A., Chan,F.K., Hanke,J., Winoto,A., and Allison,J.P. (1999). CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 162, 5813-5820.

Buchmeier,N.A. and Schreiber,R.D. (1985). Requirement of Endogenous Interferon-Gamma Production for Resolution of Listeria-Monocytogenes Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 7404-7408.

Calvo,C.R., Amsen,D., and Kruisbeek,A.M. (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, 1645-1653.

Catalfamo,M. and Henkart,P.A. (2003). Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 522-527.

Chambers,C.A., Cado,D., Truong,T., and Allison,J.P. (1997). Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9296-9301.

Chambers,C.A., Sullivan,T.J., Truong,T., and Allison,J.P. (1998). Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 3137-3143.

Chen,M.L., Pittet,M.J., Gorelik,L., Flavell,R.A., Weissleder,R., von,B.H., and Khazaie,K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 419-424.

Chen,Y., Kuchroo,V.K., Inobe,J., Hafler,D.A., and Weiner,H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265, 1237-1240.

Cher,D.J. and Mosmann,T.R. (1987). Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* 138, 3688-3694.

Chuang,E., Fisher,T.S., Morgan,R.W., Robbins,M.D., Duerr,J.M., Vander Heiden,M.G., Gardner,J.P., Hambor,J.E., Neveu,M.J., and Thompson,C.B. (2000). The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity.* 13, 313-322.

- Cilio,C.M., Daws,M.R., Malashicheva,A., Sentman,C.L., and Holmberg,D. (1998). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 is induced in the thymus upon in vivo activation and its blockade prevents anti-CD3-mediated depletion of thymocytes. *J. Exp. Med.* *188*, 1239-1246.
- Collins,M., Ling,V., and Carreno,B.M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* *6*, 223.
- Das,G., Sheridan,S., and Janeway,C.A., Jr. (2001). The source of early IFN-gamma that plays a role in Th1 priming. *J. Immunol.* *167*, 2004-2010.
- de Hooge,A.S., Berghuis,D., Santos,S.J., Mooiman,E., Romeo,S., Kummer,J.A., Egeler,R.M., van Tol,M.J., Melief,C.J., Hogendoorn,P.C., and Lankester,A.C. (2007). Expression of cellular FLICE inhibitory protein, caspase-8, and protease inhibitor-9 in Ewing sarcoma and implications for susceptibility to cytotoxic pathways. *Clin. Cancer Res.* *13*, 206-214.
- Delves,P.J. and Roitt,I.M. (2000a). The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* *343*, 37-49.
- Delves,P.J. and Roitt,I.M. (2000b). The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* *343*, 108-117.
- Demaria,S., Kawashima,N., Yang,A.M., Devitt,M.L., Babb,J.S., Allison,J.P., and Formenti,S.C. (2005). Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *11*, 728-734.
- Dighe,A.S., Richards,E., Old,L.J., and Schreiber,R.D. (1994). Enhanced In-Vivo Growth and Resistance to Rejection of Tumor-Cells Expressing Dominant-Negative Ifn-Gamma Receptors. *Immunity* *1*, 447-456.
- Egen,J.G. and Allison,J.P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity.* *16*, 23-35.
- Egen,J.G., Kuhns,M.S., and Allison,J.P. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* *3*, 611-618.
- Feurerer,M., Eulenburg,K., Loddenkemper,C., Hamann,A., and Huehn,J. (2006). Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J. Immunol.* *176*, 2857-2863.
- Gajewski,T.F., Fallarino,F., Fields,P.E., Rivas,F., and Alegre,M.L. (2001). Absence of CTLA-4 lowers the activation threshold of primed CD8+ TCR-transgenic T cells: lack of correlation with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase. *J. Immunol.* *166*, 3900-3907.
- Garcia,K.C., Teyton,L., and Wilson,I.A. (1999). Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *17*:369-97., 369-397.
- Gartner,D., Hoff,H., Gimsa,U., Burmester,G.R., and Brunner-Weinzierl,M.C. (2006). CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J. Neuroimmunol.* *172*, 73-84.

- Gett,A.V., Sallusto,F., Lanzavecchia,A., and Geginat,J. (2003). T cell fitness determined by signal strength. *Nat. Immunol.* 4, 355-360.
- Glimcher,L.H., Townsend,M.J., Sullivan,B.M., and Lord,G.M. (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 900-911.
- Gocke,A.R., Cravens,P.D., Ben,L.H., Hussain,R.Z., Northrop,S.C., Racke,M.K., and Lovett-Racke,A.E. (2007). T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J. Immunol.* 178, 1341-1348.
- Hayashi,N., Liu,D., Min,S., Ben-Sasson,Z., and Paul W.E (2002). Antigen challenge leads to in vivo activation and elimination of highly polarized TH1 memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6187-6191.
- Hernandez,J., Aung,S., Redmond,W.L., and Sherman,L.A. (2001). Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J. Exp. Med.* 194, 707-717.
- Hirst,C.E., Buzza,M.S., Bird,C.H., Warren,H.S., Cameron,P.U., Zhang,M., shton-Rickardt,P.G., and Bird,P.I. (2003). The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J. Immunol.* 170, 805-815.
- Hodi,F.S., Mihm,M.C., Soiffer,R.J., Haluska,F.G., Butler,M., Seiden,M.V., Davis,T., Henry-Spires,R., MacRae,S., Willman,A., Padera,R., Jaklitsch,M.T., Shankar,S., Chen,T.C., Korman,A., Allison,J.P., and Dranoff,G. (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 4712-4717.
- Huang,S., Hendriks,W., Althage,A., Hemmi,S., Bluethmann,H., Kamijo,R., Vilcek,J., Zinkernagel,R.M., and Aguet,M. (1993). Immune-Response in Mice That Lack the Interferon-Gamma Receptor. *Science* 259, 1742-1745.
- Hurwitz,A.A., Yu,T.F., Leach,D.R., and Allison,J.P. (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, 10067-10071.
- Intlekofer,A.M., Takemoto,N., Wherry,E.J., Longworth,S.A., Northrup,J.T., Palanivel,V.R., Mullen,A.C., Gasink,C.R., Kaech,S.M., Miller,J.D., Gapin,L., Ryan,K., Russ,A.P., Lindsten,T., Orange,J.S., Goldrath,A.W., Ahmed,R., and Reiner,S.L. (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6, 1236-1244.
- Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M. (2005). *Immunobiology*.
- Janssen,E.M., Lemmens,E.E., Wolfe,T., Christen,U., von Herrath,M.G., and Schoenberger,S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- Jenkinson,S.R., Intlekofer,A.M., Sun,G., Feigenbaum,L., Reiner,S.L., and Bosselut,R. (2007). Expression of the transcription factor cKrox in peripheral CD8 T cells reveals substantial postthymic plasticity in CD4-CD8 lineage differentiation. *J. Exp. Med.* %19;204, 267-272.

- Jordan, M.S., Singer, A.L., and Koretzky, G.A. (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat. Immunol.* *4*, 110-116.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 251-262.
- Kamijo, R., Le, J.M., Shapiro, D., Havell, E.A., Huang, S., Aguet, M., Bosland, M., and Vilcek, J. (1993a). Mice That Lack the Interferon-Gamma Receptor Have Profoundly Altered Responses to Infection with *Bacillus-Calmette-Guerin* and Subsequent Challenge with Lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine* *178*, 1435-1440.
- Kamijo, R., Shapiro, D., Le, J., Huang, S., Aguet, M., and Vilcek, J. (1993b). Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon gamma receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 6626-6630.
- Kane, L.P., Lin, J., and Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 242-249.
- Klebanoff, C.A., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., Lichtman, M.K., Gattinoni, L., Theoret, M.R., Grewal, N., Spiess, P.J., Antony, P.A., Palmer, D.C., Tagaya, Y., Rosenberg, S.A., Waldmann, T.A., and Restifo, N.P. (2004). IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1969-1974.
- Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol. Rev.* *211:214-24.*, 214-224.
- Kloetzel, P.M. (2004). The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta.* *1695*, 225-233.
- Krummel, M.F. and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* *182*, 459-465.
- Krummel, M.F. and Allison, J.P. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* *183*, 2533-2540.
- Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* *271*, 1734-1736.
- Lehner, P.J. and Cresswell, P. (2004). Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 82-89.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* *26*, 579-591.
- Lin, J. and Weiss, A. (2001). T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* *114*, 243-244.
- Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P.J., Lombard, D.B., Freeman, G.J., Nadler, L.M., Gray, G.S., and . (1993). Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J. Immunol.* *151*, 3489-3499.



- Linsley,P.S., Nadler,S.G., Bajorath,J., Peach,R., Leung,H.T., Rogers,J., Bradshaw,J., Stebbins,M., Leytze,G., Brady,W., and . (1995). Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J. Biol. Chem.* *270*, 15417-15424.
- Maker,A.V., Attia,P., and Rosenberg,S.A. (2005). Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J. Immunol.* *175*, 7746-7754.
- Male,D., Brosthoff,J., Roth,D.R., and Roitt,I. (2006). *Immunology*.
- Manjunath,N., Shankar,P., Wan,J., Weninger,W., Crowley,M.A., Hieshima,K., Springer,T.A., Fan,X., Shen,H., Lieberman,J., and von Andrian,U.H. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest* *108*, 871-878.
- Marengere,L.E., Waterhouse,P., Duncan,G.S., Mittrucker,H.W., Feng,G.S., and Mak,T.W. (1996). Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science.* *272*, 1170-1173.
- Martin,M., Schneider,H., Azouz,A., and Rudd,C.E. (2001). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med.* *194*, 1675-1681.
- Masopust,D., Vezys,V., Marzo,A.L., and Lefrancois,L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* *291*, 2413-2417.
- Masteller,E.L., Chuang,E., Mullen,A.C., Reiner,S.L., and Thompson,C.B. (2000). Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J. Immunol.* *164*, 5319-5327.
- Maszyna,F., Hoff,H., Kunkel,D., Radbruch,A., and Brunner-Weinzierl,M.C. (2003). Diversity of clonal T cell proliferation is mediated by differential expression of CD152 (CTLA-4) on the cell surface of activated individual T lymphocytes. *J. Immunol.* *171*, 3459-3466.
- Mescher,M.F., Curtsinger,J.M., Agarwal,P., Casey,K.A., Gerner,M., Hammerbeck,C.D., Popescu,F., and Xiao,Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* *211:81-92.*, 81-92.
- Miltenyi,S., Muller,W., Weichel,W., and Radbruch,A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* *11*, 231-238.
- Mueller,D.L., Jenkins,M.K., and Schwartz,R.H. (1989). Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* *7:445-80.*, 445-480.
- Mullen,A.C., High,F.A., Hutchins,A.S., Lee,H.W., Villarino,A.V., Livingston,D.M., Kung,A.L., Cereb,N., Yao,T.P., Yang,S.Y., and Reiner,S.L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science.* *292*, 1907-1910.
- Northrop,J.K. and Shen,H. (2004). CD8+ T-cell memory: only the good ones last. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 451-455.

- Opferman, J.T., Ober, B.T., and Ashton-Rickardt, P.G. (1999). Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* 283, 1745-1748.
- Pandiyani, P., Gartner, D., Soezeri, O., Radbruch, A., Schulze-Osthoff, K., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2004). CD152 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3 kinase function. *J. Exp. Med.* 199, 831-842.
- Pandiyani, P., Hegel, J.K., Krueger, M., Quandt, D., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2007). High IFN- $\gamma$  Production of Individual CD8 T Lymphocytes Is Controlled by CD152 (CTLA-4). *J. Immunol.* 178, 2132-2140.
- Parham, P. (1996). Presentation of HLA class I-derived peptides: potential involvement in allorecognition and HLA-B27-associated arthritis. *Immunol. Rev.* 154:137-54., 137-154.
- Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C.A., Shen, H., Cereb, N., Yang, S.Y., Lindsten, T., Rossant, J., Hunter, C.A., and Reiner, S.L. (2003). Control of effector CD8<sup>+</sup> T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302, 1041-1043.
- Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K., and Allison, J.P. (2004). B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 21, 401-413.
- Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., Duray, P.H., Steinberg, S.M., Allison, J.P., Davis, T.A., and Rosenberg, S.A. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8372-8377.
- Refaeli, Y., Van, P.L., Alexander, S.I., and Abbas, A.K. (2002). Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 196, 999-1005.
- Rincon, M., Flavell, R.A., and Davis, R.A. (2000). The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1328-1337.
- Roberts, A.D., Ely, K.H., and Woodland, D.L. (2005). Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J. Exp. Med.* 202, 123-133.
- Romagnani, S. (1996). Th1 and Th2 in human diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80, 225-235.
- Russ, A.P., Wattler, S., Colledge, W.H., Aparicio, S.A., Carlton, M.B., Pearce, J.J., Barton, S.C., Surani, M.A., Ryan, K., Nehls, M.C., Wilson, V., and Evans, M.J. (2000). Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature*. 404, 95-99.
- Ryan, K., Garrett, N., Mitchell, A., and Gurdon, J.B. (1996). Eomesodermin, a key early gene in *Xenopus* mesoderm differentiation. *Cell*. 87, 989-1000.

- Sallusto,F., Lenig,D., Forster,R., Lipp,M., and Lanzavecchia,A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. *401*, 708-712.
- Salomon,B. and Bluestone,J.A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* *19*:225-52., 225-252.
- Scheffold,A., Assenmacher,M., Reiners-Schramm,L., Lauster,R., and Radbruch,A. (2000). High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells. *Nat. Med.* *6*, 107-110.
- Schneider,H., Downey,J., Smith,A., Zinselmeyer,B.H., Rush,C., Brewer,J.M., Wei,B., Hogg,N., Garside,P., and Rudd,C.E. (2006). Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. *313*, 1972-1975.
- Schneider,H., Mandelbrot,D.A., Greenwald,R.J., Ng,F., Lechler,R., Sharpe,A.H., and Rudd,C.E. (2002). Cutting edge: CTLA-4 (CD152) differentially regulates mitogen-activated protein kinases (extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase) in CD4+ T cells from receptor/ligand-deficient mice. *J. Immunol.* *169*, 3475-3479.
- Schneider,H., Prasad,K.V., Shoelson,S.E., and Rudd,C.E. (1995). CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J. Exp. Med.* *181*, 351-355.
- Sharpe,A.H. and Freeman,G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 116-126.
- Shedlock,D.J. and Shen,H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* *300*, 337-339.
- Shrikant,P., Khoruts,A., and Mescher,M.F. (1999). CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. *Immunity*. *11*, 483-493.
- Skapenko,A., Leipe,J., Lipsky,P.E., and Schulze-Koops,H. (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res. Ther.* *7 Suppl 2*:S4-14. *Epub*; %2005 Mar 16., S4-14.
- Snapper,C.M. and Paul,W.E. (1987). Interferon-Gamma and B-Cell Stimulatory Factor-I Reciprocally Regulate Ig Isotype Production. *Science* *236*, 944-947.
- Sullivan,B.M., Juedes,A., Szabo,S.J., von Herrath,M., and Glimcher,L.H. (2003). Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 15818-15823.
- Sun,J.C. and Bevan,M.J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* *300*, 339-342.
- Sutmuller,R.P., van Duivenvoorde,L.M., van,E.A., Schumacher,T.N., Wildenberg,M.E., Allison,J.P., Toes,R.E., Offringa,R., and Melief,C.J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in

antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* *194*, 823-832.

Suto,A., Wurster,A.L., Reiner,S.L., and Grusby,M.J. (2006). IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J. Immunol.* *177*, 3721-3727.

Szabo,S.J., Kim,S.T., Costa,G.L., Zhang,X., Fathman,C.G., and Glimcher,L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* *100*, 655-669.

Szabo,S.J., Sullivan,B.M., Stemmann,C., Satoskar,A.R., Sleckman,B.P., and Glimcher,L.H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* *295*, 338-342.

Taylor,M.A., Chaudhary,P.M., Klem,J., Kumar,V., Schatzle,J.D., and Bennett,M. (2001). Inhibition of the death receptor pathway by cFLIP confers partial engraftment of MHC class I-deficient stem cells and reduces tumor clearance in perforin-deficient mice. *J. Immunol.* *167*, 4230-4237.

Teixeira,L.K., Fonseca,B.P., Vieira-de-Abreu,A., Barboza,B.A., Robbs,B.K., Bozza,P.T., and Viola,J.P. (2005). IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J. Immunol.* *175*, 5931-5939.

Tivol,E.A., Borriello,F., Schweitzer,A.N., Lynch,W.P., Bluestone,J.A., and Sharpe,A.H. (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*, 541-547.

Townsend,M.J., Weinmann,A.S., Matsuda,J.L., Salomon,R., Farnham,P.J., Biron,C.A., Gapin,L., and Glimcher,L.H. (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity.* *20*, 477-494.

van der Merwe,P.A., Bodian,D.L., Daenke,S., Linsley,P., and Davis,S.J. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* *185*, 393-403.

van Elsas A., Hurwitz,A.A., and Allison,J.P. (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*, 355-366.

van Elsas A., Suttmuller,R.P., Hurwitz,A.A., Ziskin,J., Villasenor,J., Medema,J.P., Overwijk,W.W., Restifo,N.P., Melief,C.J., Offringa,R., and Allison,J.P. (2001). Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J. Exp. Med.* *194*, 481-489.

van Stipdonk,M.J., Hardenberg,G., Bijker,M.S., Lemmens,E.E., Droin,N.M., Green,D.R., and Schoenberger,S.P. (2003). Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. *Nat. Immunol.* *4*, 361-365.

- Walunas,T.L., Bakker,C.Y., and Bluestone,J.A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J. Exp. Med.* *183*, 2541-2550.
- Walunas,T.L., Lenschow,D.J., Bakker,C.Y., Linsley,P.S., Freeman,G.J., Green,J.M., Thompson,C.B., and Bluestone,J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* *1*, 405-413.
- Waterhouse,P., Penninger,J.M., Timms,E., Wakeham,A., Shahinian,A., Lee,K.P., Thompson,C.B., Griesser,H., and Mak,T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in C<sub>t</sub>la-4. *Science.* *270*, 985-988.
- Watts,C. and Powis,S. (1999). Pathways of antigen processing and presentation. *Rev. Immunogenet.* *1*, 60-74.
- Wei,B., da Rocha,D.S., Wang,H., and Rudd,C.E. (2007). CTL-associated antigen-4 ligation induces rapid T cell polarization that depends on phosphatidylinositol 3-kinase, Vav-1, Cdc42, and myosin light chain kinase. *J. Immunol.* *179*, 400-408.
- Weiss,A. and Littman,D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* *76*, 263-274.
- Weninger,W., Crowley,M.A., Manjunath,N., and von Andrian,U.H. (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* *194*, 953-966.
- Werlen,G. and Palmer,E. (2002). The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 299-305.
- Wherry,E.J., Teichgraber,V., Becker,T.C., Masopust,D., Kaech,S.M., Antia,R., von Andrian,U.H., and Ahmed,R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* *4*, 225-234.
- Wu,C.Y., Kirman,J.R., Rotte,M.J., Davey,D.F., Perfetto,S.P., Rhee,E.J., Freidag,B.L., Hill ,B.J., Douek ,D.C., and Seder,R.A. (2002). Distinct lineages of TH1 cells have differential capacities for memory cell generation *in vivo*. *Nat. Immunol.* *3*.
- Zhang,Y., Apilado,R., Coleman,J., Ben-Sasson,S., Tsang,S., Hu-Li,J., Paul,W.E., and Huang,H. (2001). Interferon gamma stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J. Exp. Med.* *194*, 165-172.

## 8 Abkürzungen

---

530/30 nm	Bandpassfilter für Licht des Wellenlängenbereichs 530 nm $\pm$ 30 nm
670/LP nm	Bandpassfilter für Licht längerwellig als 670 nm (engl.: long pass)
Abb.	Abbildung
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod (engl.: activation induced cell death)
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
B7-1	= CD80
B7-2	= CD86
B7-Familie	B7-1 & B7-2 bzw. CD80 & CD86
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare (engl.: base pairs)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
BTLA	engl.: B- and T-lymphocyte attenuator
BZR	B-Zell Rezeptor
CD	engl.: cluster of differentiation
CD80	= B7-1
CD86	= B7-2
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
cFLIP	engl.: cellular Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein
CFSE	Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester (CFDA-SE)
c-Jun	Transkriptionsfaktor
cKrox	Zinkfinger enthaltender Transkriptionsfaktor

---

CLP	engl.: common lymphoid progenitor
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (engl.: cytotoxic T-lymphocyte)
CTLA-4	engl.: cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CD152)
CTLA-4-Ig	CTLA-4 Immunglobulin Fusionsprotein
Cy5	Cyanin-5
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
DTT	Dithiothreitol
DZ	dendritische Zelle
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: enzyme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	engl.: extracellular regulated kinase
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescence activated cell sorting)
FADD	engl.: Fas associated protein via death domain
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FPLC	engl.: fast protein liquid chromatography
GATA-3	GATA-bindendes Protein 3
GFP	engl.: green fluorescent protein
GM-CSF	engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

---

Grb2	engl.: growth factor receptor-bound protein 2
h	Stunde
HBS	engl.: HEPES-buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
ICAM	engl.: intercellular cell adhesion molecule
ICOS-L	engl.: inducible costimulator ligand
ITAM	engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
JNK	engl.: c-Jun N-terminal kinase
LAT	engl.: linker of activated T cells
Lck	engl.: leukocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	engl.: lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetische Zellsortierung (engl.: magnetic cell sorting)
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
NFAT	engl.: nuclear factor of activated T cells
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen



---

nm	Nanometer
nM	nanomolar
PAMP	Pathogenassoziiertes molekulares Muster (engl.: pathogen associated molecular pattern)
PBS	engl.: phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PD-1	engl.: programmed death-1
PD-L1	engl.: programmed death-1 ligand
PD-L2	engl.: programmed death-2 ligand
PE	Phycoerythrin
PerCp	engl.: Peridinin-chlorophyll-protein Complex
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC- $\gamma$ 1	engl.: phospholipase C gamma 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	engl.: type 2 protein serine/threonine phosphatase
RA	rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	engl.: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	etwa 100 Aminosäuren lange Proteindomäne die insbesondere Peptide mit phosphoryliertem Tyrosin erkennt (engl.: Src-homology 2)
SHP-2	engl.: SH2-containing tyrosine phosphatase
SLE	systemischer Lupus erythematoses

---

SPF	engl.: specific-pathogen free
SLP-76	engl.: SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TAP	engl.: transporter associated with antigen processing
TBS	engl.: tris-buffered saline
TBS-T	engl.: tris-buffered saline + Tween-20
T <sub>CM</sub>	zentrale T-Gedächtniszellen (engl.: central memory T cells)
T <sub>EM</sub>	Effektor-T-Gedächtniszellen (engl.: effector memory T cells)
TGF- $\beta$	engl.: transforming growth factor- $\beta$
T <sub>h</sub>	T-Helfer-Zellen
TLR	engl.: toll like receptor
T <sub>M</sub>	T-Gedächtniszellen (engl.: memory T cells)
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TNFR-1	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (CD120a)
TRADD	engl.: TNFR superfamily member 1a associated protein via death domain
T <sub>reg</sub> Zellen	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell Rezeptor
VDJ	engl.: V-variable, D-diversity, J-joining
VLA-4	engl.: very late antigen 4 (CD49d/CD29)
WT	Wildtyp
Zap-70	engl.: zeta-chain-associated protein kinase 70

## 9 Lebenslauf

---

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## 10 Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Monika Brunner-Weinzierl, die mich bei meiner Arbeit beraten und betreut hat. Ihre kompetente Anleitung war für mich von großem Wert.

Den Herrn Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester und Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich, dass sie es mir ermöglicht haben, meine Doktorarbeit an der Charité und am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) anzufertigen.

Dank schulde ich auch den Labor-Managerinnen und den Mitarbeitern anderer Service-Einrichtungen am DRFZ, deren Wissen ich stets nutzen und auf deren Unterstützung ich mich stets verlassen konnte.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Monika Brunner-Weinzierl.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung jeglicher Art.

Herzlichen Dank an meine Freundin Mona Köhler für ihre Geduld und Unterstützung

# 11 Erklärung

---

„Ich, J. Kolja E. Hegel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Untersuchung der CD152 vermittelten Regulation der Effektorfunktionen von CD8 T-Lymphozyten* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den .....

.....

Kolja Hegel