2. Regulation der T-Zelleffektorfunktion und des aktivierungsinduzierten Zelltods

2.1 T-Zellrezeptorvermittelte Signale

2.1.1 T-Zellspezifität versus T-Zellkreuzreaktivität

Für die Stimulation eines TCR durch ein Antigen muss ein Peptid dieses Antigens gebunden an ein MHC-Protein präsentiert werden. $CD8^+$-T-Zellen erkennen Peptide bestehend aus 8 bis 11 Aminosäuren, gebunden an MHC-I, das auf nahezu allen Zellen exprimiert wird. $CD4^+$-T-Zellen erkennen hingegen an MHC-II gebundene Peptide. MHC-II wird vornehmlich auf klassischen APC, wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, nachgewiesen. An MHC-II gebundene Peptide können seitlich aus der Bindungstasche herausragen und zwischen 12 und 24 Aminosäuren lang sein. (Wilson et al., 2004). Nachdem zunächst vermutet worden war, dass T-Zellen absolut antigenspezifisch sind, d.h. dass eine individuelle T-Zelle nur durch ein einziges Peptid aktiviert werden kann (Townsend et al., 1986), hat sich im weiteren gezeigt, dass verschiedene Peptide eine T-Zelle stimulieren können (Eisen, 2001; Zinkernagel, 2000). Mittlerweile werden Spezifität und Kreuzreaktivität (T cell degeneracy) als zwei sich ergänzende Eigenschaften des TCR verstanden.

T-Zellspezifität gewährleistet die Aktivierung der T-Zellen durch pathogene Organismen und verhindert pathologische Autoimmunreaktionen. T-Zellkreuzreaktivität spielt hingegen bei der T-Zellreifung im Thymus eine bedeutende Rolle. Hier werden T-Zellen mit sehr hoher Affinität für körpereigene pMHC zerstört (negative Selektion), während T-Zellen mit geringer Affinität die Passage durch den Thymus überstehen (positive Selektion) (Kappler et al., 1987; Kisielow et al., 1988; Sebzda et al., 1994; Shih und Allen, 2004). Damit die T-Zellselektion im Thymus reife T-Zellen mit einem breiten Antigenspektrum generiert, müssen wahrscheinlich nur wenige Peptide im Thymus präsentiert werden. So wurde gezeigt, dass Mäuse, die in ihrem Thymus nur einen einzigen pMHC exprimierten, ein nahezu normales T-Zellspektrum entwickelten (Ignatowicz et al., 1996; Ignatowicz et al., 1997).

Neben der T-Zellselektion im Thymus, ist die TCR-Kreuzreaktivität sehr wahrscheinlich auch an der Aufrechterhaltung des Gedächtnis-T-Zellpools beteiligt (Freitas und Rocha, 1999; Shih und Allen, 2004; Sloan-Lancaster und Allen, 1996; Sprent und Surh, 2002). Man vermutet, dass Gedächtniszellen periodisch mit Antigen stimuliert werden, für das sie nur eine geringe Affinität haben. Die Stärke der TCR-Ligation reicht aus, um die Gedächtniszellen vor dem Zelltod zu schützen und ihnen einen Platz in dem begrenzten Gedächtniszellpool zu erhalten.

Die Vorstellung periodischer Gedächtniszellstimulationen ist jedoch keineswegs unumstritten und es gibt Arbeiten, die nahelegen, dass beispielsweise $CD8^+$-Gedächtnis-T-Zellen ohne wiederholte TCR-Stimuation überleben (Hou et al., 1994; Lau et al., 1994).

Neben den unterschiedlichen Funktionen ist auch der genaue Umfang der TCR-Kreuzreaktivität unklar. Einige Autoren postulieren, dass TCR-Kreuzreaktivität nicht bedeutet, dass völlig unähnliche Antigene erkannt werden, sondern dass bestimmte TCR-pMHC-Kontaktpunkte vorhanden sein müssen und wahrscheinlich auch die räumliche Orientierung dem primär stimulierenden Peptid entsprechen muss (Shih und Allen, 2004). Andere Autoren setzen die Grenzen der Kreuzreaktivität wesentlich weiter und geben die maximale Anzahl möglicher Liganden für $CD4^+$-T-Zellklone mit über 100000 und für $CD8^+$-T-Zellklone mit über 10000 an (Wilson et al., 2004). $CD8^+$-T-Zellen weisen ein geringeres Maß an Kreuzreaktivität auf, weil sie generell eine höhere Affinität für agonistische pMHC besitzen (Davis et al., 1998). Die geringere Anzahl von Aminosäuren, die von MHC-I gebunden werden können und die Bedingung, dass Peptide bei Bindung an den MHC-I vollständig in die Bindungstasche passen müssen, sind mögliche Gründe für diesen Unterschied (Wilson et al., 2004). Da MHC-I, anders als MHC-II, ubiquitär im Körper exprimiert wird, stiege mit höherer Kreuzreaktivität möglicherweise auch die Gefahr von pathologischen Autoimmunreaktionen. Hinweise darauf, dass die Interaktion des TCR mit dem pMHC weit komplexer ist als die reine Peptidsequenz vermuten lässt, stammen u.a. aus der multiplen Sklerose (MS)-Forschung. Dem immunogenen Peptid des myelinbasischen Proteins (MBP) MBPp85-99 (Aminosäuren von Position 85 bis Position 99) wird eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der MS zugeschrieben. Interessanterweise wurde gezeigt, dass einige MBPp85-99-spezifische T-Zellklone aus dem Blut von MS-Patienten mit viralen Peptiden kreuzreagierten, die sich in der Aminosäuresequenz ganz wesentlich von MBPp85-99 unterschieden, während andere Peptiden, die nur in wenigen Aminosäuren vom Ausgangspeptid differierten, nicht in der Lage waren diese T-Zellklone zu aktivieren (Wucherpfennig und Strominger, 1995). Dies legt nahe, dass neben der Aminosäurensequenz eines Peptids, seine Tertiärstruktur, die Bindung an den MHC und die daraus resultierenden Bindungsstellen für den TCR die Wirkung eines Peptids festlegen. Die Hypothese des molekularen Mimikrys viraler Peptide bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen ist jedoch nicht unumstritten. In Einklang mit diesem Modell wurde gezeigt, dass die Vakzinierung von Mäusen mit einem Peptid der Hepatits-B-Virus-Polymerase, das mit einem MBP-Peptid sechs aufeinander folgende Aminosäuren gemein hatte, in diesen Mäusen die experimentelle

Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), ein Tiermodell mit histopathologischen und symptombezogenen Parallelen zur MS, induzierte (Fujinami und Oldstone, 1985). Ein ähnliches Ergebnis konnte für ein Peptid des human Herpesvirus-6 gezeigt werden (Tejada-Simon et al., 2003).

Untersuchungen zur Aufklärung der TCR-Kreuzreaktivität wurden u.a. an T-Zellklonen durchgeführt. T-Zellklone werden durch wiederholte Stimulation mit einem pMHC generiert. Peptide, die sich von diesem agonistischen Peptid durch Austausch einzelner Aminosäuren an Positionen, die essentiell für den Kontakt mit dem TCR sind, unterscheiden, nennt man veränderte Peptidliganden (altered peptide ligands, APL). Für die meisten Peptide existiert ein primärer TCR-Kontaktpunkt, dessen Substitution in der Regel zu einem Totalverlust der T-Zelleffektorfunktion führt. An sekundären TCR-Kontaktstellen sind hingegen unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen möglich (Sloan-Lancaster und Allen, 1996). T-Zelleffektorfunktionen, die durch ein APL induziert werden, können sich von denen des agonistischen Peptids grundlegend unterscheiden. APL können völlig wirkungslos sein oder als partielle Agonisten, beispielsweise Zytokinsekretion ohne T-Zellproliferation induzieren. Durch Wandel des Zytokinprofils, von einer inflammatorischen hin zu einer antiinflammatorischen Zytokinantwort, können APL den Ausgang einer Immunantwort beeinflussen. APL fungieren ferner als Antagonisten, wenn sie dosisabhängig die Effekte des agonistischen Peptids blockieren oder sogar Anergie induzieren. (Genain und Zamvil, 2000; Sloan-Lancaster und Allen, 1996). Um diese unterschiedlichen Wirkungsweisen der APL zu erklären, wird postuliert, dass bei jeder dieser Reaktionen ein bestimmtes Aktivierungsniveau überschritten wird (threshold of activation model) (Sloan-Lancaster und Allen, 1996).

Die Fähigkeit der APL, eine T-Zellantwort mit inflammatorischem Zytokinprofil in eine antiinflammatorische Reaktion zu wandeln, machte die Nutzung dieser Peptide als Therapeutika für Autoimmunerkrankungen attraktiv. Aktivierte $CD4^+$-T-Zellen, spezifisch für Peptide des MBP oder des Proteolipidproteins (PLP), induzieren in Mäusen experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE). Man konnte zeigen, dass autoreaktive T-Lymphozyten, die IL-2, IFN-γ und TNF-α sezernieren, im ZNS Entzündung und Gewebsuntergang verursachen, während autoreaktive T-Zellen, die IL-4, IL-10 und TGF (transforming growth factor)-β1 produzieren, eine antiinflammatorische Wirkung im ZNS haben (Miller et al., 1992; Racke et al., 1991). APL von MBP- oder PLP-Peptiden konnten interessanterweise die Induktion der EAE verhindern (Gaur et al., 1997; Nicholson et al., 1997).

Die ermutigenden Ergebnisse bei der Behandlung der EAE waren Grundlage für zwei klinische Studien mit APL an MS-Patienten. In der ersten Studie erhielten diese im Rahmen von Dosisfindungsuntersuchungen unterschiedliche Konzentrationen eines APL des MBPp83-99. Zellbiologische Begleituntersuchungen bei Patienten, die hohe APL-Dosen erhalten hatten, zeigten bei *in vitro* Restimulation autologer T-Zellen sowohl mit MBPp83-99 als auch mit dem APL einen wesentlichen Anstieg der Sekretion, des antiinflammatorischen Zytokins IL-13. Wegen einer systemischen Überempfindlichkeitsreaktion, wurde die Studie vorzeitig abgebrochen. Des weiteren fanden die Autoren bei einem Patienten, der mit einer geringen APL-Dosis behandelt worden war, eine Zunahme der inflammatorischen Läsionen in der zerebralen Magnetresonanztomographie (MRT) (Kappos et al., 2000). Ähnlich komplex waren die Ergebnisse der zweiten Studie (Bielekova et al., 2000). Hier führte ein anderes APL des MBPp83-99 bei mehreren Patienten zur Expansion MBP-spezifischer T-Zellen mit proinflammatorischem Zytokinprofil. Ein Teil dieser Patienten erlitt darüber hinaus eine Exazerbation ihrer MS-Erkrankung. Andere Patienten erfuhren hingegen unter der Therapie mit dem gleichen APL eine Besserung der klinischen Symptome und eine Verminderung der inflammatorischen Läsionen im MRT (Bielekova et al., 2000).
APL scheinen daher in vivo im Menschen sehr unterschiedliche Reaktionen zu induzieren. Obwohl es sich hierbei um potentiell wirkungsvolle Substanzen zu handeln scheint, sind vor einem therapeutischen Einsatz Kenntnisse nötig, die eine genaue Vorhersage der APL-induzierten T-Zelleffektorfunktionen erlauben.

2.1.2 Eigene Ergebnisse

2.1.2.1 Modulation des Zytokinprofils autoreaktiver T-Zellklone durch Substitution einer einzelnen Aminosäure im agonistischen Peptid

In der nachfolgend erläuterten Arbeit analysierten wir, vor Durchführung der oben beschriebenen klinischen Studien und tierexprimentellen Modelle, den Einfluss unterschiedlicher APL des MBPp83-99 auf die Effektorfunktionen verschiedener T-Zellklone (Windhagen et al., 1995). Wir zeigten, dass innerhalb des 17 Aminosäuren langen Peptids MBPp83-99 die Aminosäuren der Positionen 89 und 92 wesentliche MHC-II-Bindungspunkte sind. Für den TCR des MBPp83-99-spezifischen T-Zellklons Ob1A12 stellen die Positionen 90 und 91 kritische TCR-Kontaktpunkte dar. Während eine Alanin (A)-Substitution an Position 93 (p93A) für das dort ansonsten vorhandene Lysin (K) nur eine mäßige Reduktion

der T-Zellproliferation zur Folge hatte, inhibierte eine Alanin (A)-, eine Asparginsäure (D)- oder eine Lysin (K)-Substitution des normalerweise an Position 90 stehenden Histidin (H) die T-Zellproliferation nahezu vollständig. Ebenso blockierte p90A oder p91A die $p56^{lck}$-Aktivierung und p90A den Ca^{++}-Einstrom als Zeichen der T-Zell-Aktivierung. Interessanterweise sezernierte der MBPp83-99-spezifische T-Zellklon jedoch nach Stimulation mit p90A oder p90D, trotz blockierter Proliferation, größere Mengen des antiinflammatorischen TGF-β1. Die bei Stimulation mit dem agonistischen MBPp83-99 beobachtete Sekretion von IL-2, IL-4, IL-10 und IFN-γ kam hingegen zum Erliegen. Ähnliche Ergebnisse fanden wir mit einem anderen MBPp83-99-spezifischen T-Zellklon (Ob3D1.7) des gleichen MS-Patienten. Hier führte die Stimulation mit dem APL p93A im Vergleich zur Stimulation mit MBPp83-99 zu einer Hemmung der Proliferation und zu einer Heraufregulation des TGF-β1.

Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass APL in der Lage sind den funktionellen Phänotyp eines T-Zellklons dramatisch zu verändern. Dies war insbesondere interessant, weil zum damaligen Zeitpunkt angenommen wurde, dass reife T-Zellen nach wiederholter Stimulation nicht mehr in der Lage sind, ihr Zytokinprofil zu verändern. Die Sekretion des antiinflammatorischen TGF-β1 nach Stimulation mit dem APL war darüber hinaus ermutigend, da an anderer Stelle gezeigt worden war, dass TGF-β1 für den Suppressor Effekt regulatorischer T-Zellen verantwortlich ist (Chen et al., 1994). Unsere Arbeit bildete daher mit anderen Publikation die Grundlage für die oben aufgeführten tierexperimentellen Untersuchungen und klinischen Studien mit APL.

Die Beobachtung, dass die Alaninsubstitution an Position 93 bei dem einen T-Zellklon (Ob1A12) die T-Zellproliferation nur mäßig vermindert, während die gleiche Substitution für den anderen T-Zellklon (Ob3D1.7) des selben Patienten das Sistieren der Proliferation und die Sekretion von TGF-β1 zur Folge hat, zeigte jedoch schon in unserer Arbeit, dass die Reaktionen auf APL im Menschen wesentlich vielfältiger sind, als dies bei Inzuchtmäusen der Fall zu seien scheint.

2.2 T-Zellkostimulation

2.2.1 Aktivierung naiver T-Zellen

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Aktivierung naiver T-Zellen das alleinige Signal über einen TCR nicht ausreicht (Bretscher und Cohn, 1970; Plas et al., 2002). Neben dem antigenspezifischen Signal über den TCR ist ein antigenunabhängiges, kostimulatorisches Signal notwendig. Dieses Signal resultiert im Allgemeinen aus der Bindung eines Kostimulationsrezeptors auf der T-Zelle an einen Kostimulationsliganden auf einer APC (Bretscher, 1999). Signale über Kostimulationsmoleküle, insbesondere über CD28, sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden.

Nach Bildung des pMHC/TCR-Komplexes und einem adäquaten Kostimulationssignal beginnen naive T-Zellen zu proliferieren, sich zu differenzieren und Zytokine zu produzieren. Erhalten naive T-Zellen hingegen lediglich ein Signal über den TCR, ohne dass ein kostimulatorisches Signal vorhanden ist, kommt es zur T-Zellanergie. Mit Anergie bezeichnet man einen Zustand bei dem eine nachfolgende, optimale Stimulation der T-Zelle über den TCR und über ein kostimulatorisches Molekül nicht zur Aktivierung der T-Zelleffektorfunktionen führt (Bretscher und Cohn, 1970; Gimmi et al., 1993; Harding et al., 1992; Jenkins und Schwartz, 1987; Schwartz, 1990; Schwartz, 2003). T-Zellanergie kann *in vitro* durch mehrtägige Kultur der T-Zellen mit IL-2 und anschließende antigenspezifische Stimulation durch CD58/LFA-3-exprimierende APC revidiert werden. CD58/LFA-3 ist ein Ligand des auf T-Zellen exprimierten Kostimulationsmoleküls CD2/LFA-2. Während es im Rahmen der T-Zellanergie zur Herunterregulation des CD2/LFA-2 kommt, induziert die T-Zellkultur mit IL-2 die Reexpression des CD2/LFA-2-Moleküls (Boussiotis et al., 1994). Man nimmt an, dass T-Zellanergie ein wichtiger Mechanismus der peripheren Toleranz ist, der die periphere Aktivierung höheraffiner, autoreaktiver T-Zellen, die nicht im Thymus zerstört wurden, verhindert (Liu und Janeway, 1992).

Bei *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass das pMHC-Molekül und der Kostimulationsligand für die T-Zell-Aktivierung nicht notwendigerweise auf der gleichen Zelle sitzen müssen. Entsprechend konnte in einem tierexperimentellen Modell demonstriert werden, dass Fibroblasten, die ein definiertes fremdes Antigen exprimieren, $CD8^+$-T-Zellen aktivieren, ohne dass hierzu ein direktes, auf dem Fibroblasten befindliches kostimulatorisches Signal nötig ist. Voraussetzung war jedoch, dass die Fibroblasten lymphatisches Gewebe erreichen konnten. Es wurde postuliert, dass die antigenspezifischen

T-Zellen Kostimulation durch im lymphatischen Gewebe ansässige APC erhalten (Kundig et al., 1995; Ohashi et al., 1991). Dies könnte auch durch *de novo* Generierung lympathischen Gewebes in peripheren Organen erreicht werden. Interessanterweise findet man bei der Hashimoto Thyroiditis und der rheumatoiden Arthritis, beides Autoimmunerkrankungen, *de novo* generiertes lymphatisches Gewebe in der Schilddrüse bzw. im Synovialgewebe (Zinkernagel, 2000).

Trotz der wichtigen Rolle kostimulatorischer Signale bei der Aktivierung naiver T-Zellen, gibt es T-Zellpopulationen, die weniger kostimulationsabhängig sind. So können präaktivierte T-Zellen (T-Effektorzellen) oder T-Gedächtniszellen auch in Abwesenheit kostimulatorischer Signale aktiviert werden (Croft, 1994; Croft et al., 1994; Dubey et al., 1996; Fuchs und Matzinger, 1992; Luqman und Bottomly, 1992; McKnight et al., 1994; Ronchese und Hausmann, 1993; Sagerstrom et al., 1993). T-Effektor- und T-Gedächtniszellen benötigen darüber hinaus zur Aktivierung geringere Antigenkonzentrationen, weniger peptidbeladene MHC-Proteine und sind in der Lage, durch Peptide mit geringer TCR-Bindungsaffinität stimuliert zu werden (Kimachi et al., 1997; Kimachi et al., 2003; London et al., 2000; Rogers et al., 2000).

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde das Konzept der Aktivierungsschwelle entwickelt, das besagt, dass die Summe aus der Stärke des TCR-Signals und der Kostimulationssignale darüber entscheidet, ob und in welchem Umfang eine T-Zelle aktiviert wird (Alegre et al., 2001; Salomon und Bluestone, 2001). Man nimmt an, dass T-Effektor- und T-Gedächtniszellen eine geringere Aktivierungsschwelle als naive T-Zellen haben.

2.2.2 Programmierter Zelltod

Programmierter Zelltod, bzw. Apoptose, beeinflußt in wesentlichem Maße die T-Zellhomöostase. Caspasen (cystein proteinases with specifity for aspartate residues) spielen dabei eine bedeutende Rolle. Sie werden als Proenzyme synthetisiert (Zymogene) und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Man unterscheidet einen extrinsischen oder todesrezeptorvermittelten von einem intrinsischen oder mitochondrienvermittelten Todespfad. Darüber hinaus ist auch das endoplasmatische Retikulum am Ablauf des programmierten Zelltods beteiligt. Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Ligation eines Todesrezeptors initiiert. Todesrezeptoren sind Mitglieder der Tumornekrosefaktorrezeptor (TNFR)-Genfamilie. Sie sind dadurch charakterisiert, dass sie zwei cystinreiche extrazelluläre

Regionen und eine intrazelluläre Todesdomäne (DD) besitzen. Bisher wurden die Todesrezeptoren TNF-R1 (CD120a), CD95 (Fas, APO-1), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), TRAIL-R1 (DR4, APO-2), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2) und DR6 identifiziert. Nach Ligation durch einen todesrezeptorinduzierenden Liganden kommt es zur Rezeptortrimerisierung und nachfolgend zur Bildung des todesinduzierenden Signalkomplexes (DISC), bestehend aus dem Todesrezeptor, dem Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein) und der Initiatorcaspase, Caspase-8 oder -10. FADD bindet über die Todesdomäne (DD) an den zytoplasmatischen Teil des Todesrezeptors und rekrutiert über die Todeseffektordomäne (DED) die Caspasen-8 und -10 in den DISC. Die Bildung des DISC initiiert die Spaltung und Aktivierung der Caspasen-8 und -10. Im Gegensatz hierzu vermitteln todesrezeptorunabhängige Signale, wie Wachstumsfaktorentzug, ionisierende Bestrahlung oder Zytostatika, programmierten Zelltod über den mitochondrialen Weg. Hierbei kommt es zur Aktivierung und mitochondrialen Translokation der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax oder Bak. Oligomerisation von Bax und Einbau dieser Oligomere in die Mitochondrienmembran induziert die Freisetzung des Cytochrom c in das Zytosol. Anschließend oder gleichzeitig kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Zytosolisches Cytochrom c ermöglicht die Bildung des Apoptosoms bestehend aus Cytochrom c, APAF-1 und Procaspase-9. APAF-1 bindet hierbei über eine CARD (caspase recruiting domain) an Caspase-9. Die Apoptosombildung ist streng ATP-abhängig und induziert die Spaltung und Aktivierung der Initiatorcaspase-9. Die Initiatorcaspasen-8 und -9 aktivieren nachfolgend die Effektorcaspasen, Caspase-3, -6 und -7. Dies führt zur Spaltung weiterer zellulärer Substrate und zur Induktion der biochemischen und morphologischen Veränderungen der Apoptose. Die Spaltung von ICAD (inhibitor of caspase-3-activated DNase) führt etwa zur Freisetzung von CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), und dies verursacht die CAD-vermittelte DNA-Fragmentierung im Zellkern. Die Spaltung des nukleären Lamins ist hingegen an der Chromatinkondensation beteiligt (Danial und Korsmeyer, 2004; Debatin und Krammer, 2004; Schulze-Bergkamen und Krammer, 2004). Neben der Freisetzung von Cytochrom c gelangen, nach Aktivierung des intrinsischen Zelltodwegs,, die proapoptotischen Proteine AIF (apoptosis-inducing factor), Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase), Omi/HtrA2 und Endonuclease G in das Zytosol. Während AIF einen apoptoseähnlichen, caspaseunabhängigen Zelltod induziert, verstärken Smac/Diablo und Omi/HtrA2 die Caspaseaktivität durch direkte Hemmung der IAPs (inhibitor of apoptosis proteins). So inaktiviert beispielsweise

Smac/Diablo das IAP-Familienmitglied XIAP und verhindert die XIAP-vermittelte Hemmung der Caspase-3, -7 und -9 (Schulze-Bergkamen und Krammer, 2004; Wu et al., 2000).

Der Ablauf des programmierten Zelltods wird durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert. Auf der Ebene des Mitochondriums beeinflussen insbesondere Mitglieder der Bcl-2-Familie die Integrität der Mitochondrien. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind durch Bcl-2-Homologieregionen (BH1-4) gekennzeichnet und werden in eine pro- und eine antiapoptotische Gruppe unterteilt. Die proapoptotischen Bax und Bak sind unmittelbar an dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt. Hingegen realisieren beispielsweise Bid und Bim, zwei Bcl-2-Mitglieder, die nur die BH3-Region (BH3-only) aufweisen, ihre proapoptotische Wirkung über die Aktivierung von Bak und Bax. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L wirken schließlich indem sie proapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder inhibieren. Auf der Ebene der Caspasen beeinflussen Mitglieder der IAP-Familie den programmierten Zelltod. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine gemeinsame BIR (baculoviral IAP repeat)-Domäne aus. Die zur IAP-Familie gehörenden XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und survivin regulieren die Apoptose durch direkte Inhibition der Caspasen-3, -7 und -9 (Danial und Korsmeyer, 2004; Debatin und Krammer, 2004; Schulze-Bergkamen und Krammer, 2004). Weiter oben in der extrinsischen Apoptosesignalkaskade hemmt FLIP (Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme inhibitory protein) (Casper, CLARP, FLAME-1 oder MRIT) direkt die Caspase-8-Aktivierung (Han et al., 1997; Inohara et al., 1997; Irmler et al., 1997; Shu et al., 1997; Srinivasula et al., 1997). Zelluläres FLIP (c-FLIP) wird als 55kDa großes c-$FLIP_{lang}$ (c-$FLIP_L$) und als 26 kDa großes c-$FLIP_{kurz}$ (c-$FLIP_S$) exprimiert (Bertin et al., 1997; Hu et al., 1997; Thome et al., 1997). c-$FLIP_S$ enthält zwei N-terminale Todeseffektordomänen (DED). Das Protein verhindert die Rekrutierung der Caspase-8 in den DISC durch Konkurrenz um die FADD-Bindungsstelle und inhibiert so die CD95/Fas-vermittelte Apoptose (Kirchhoff et al., 2000a). c-$FLIP_L$ enthält ebenfalls zwei N-terminale DEDs und hat darüber hinaus noch eine caspaseartige Domäne, die allerdings keine katalytische Aktivität besitzt (Thome und Tschopp, 2001). Neuere Arbeiten legen jedoch nahe, dass $FLIP_L$ Heterokomplexe mit Caspase-8 oder -10 formt, die proteolytisch aktiv sind.

Abhängig von der $FLIP_L$-Konzentration im DISC, kommt es demnach bei hohen $FLIP_L$-Konzentrationen zur Sättigung der FADD-Moleküle und zur Hemmung der Caspase-8-oder -10-Rekrutierung und bei geringeren Konzentrationen zur Ausbildung von Heterodimeren mit Caspase-8 oder -10 und anschließender Spaltung dieser Caspasen (Boatright et al., 2004; Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002). Die Beobachtung, dass es nicht zu einer

vollständigen Prozessierung der Caspase-8 kommt und dass Caspase-8 im DISC verweilt, erklärt möglicherweise die nicht-apoptotischen Eigenschaften, die für diese Caspase u.a. beschrieben wurden (Boatright et al., 2004; Chun et al., 2002; Peter, 2004).

FLIP-Expression wird durch den Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor-κB (NF-κB) gesteuert, der an der Regulation zahlreicher antiapoptotischer Proteine, so zum Beispiel cIAP1, cIAP2, Bfl-1 und Bcl-x_L, beteiligt ist (Chen et al., 2000; Schulze-Bergkamen und Krammer, 2004; Wang et al., 1998). NF-κB wird wiederum u.a. über Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase- oder AKT/Proteinkinase-B (PKB)-abhängige Signale aktiviert. Das Tumor-Suppressorgen p53 hingegen reguliert die Transkription zahlreicher proapoptotischer Proteine, so zum Beispiel die Expression von Bax, PUMA und NOXA sowie der Todesrezeptoren CD95/Fas, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Schulze-Bergkamen und Krammer, 2004).

Der extrinsische und der intrinsische Apotoseweg sind durch das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid mit einander verknüpft. Bid wird durch die aktivierte Caspase-8 gespalten und trunkiertes Bid (t-Bid) transloziert zum Mitochondrium, wo es über die Aggregation von Bax oder Bak den intrinsischen/mitochondrialen Apoptoseweg induziert (Korsmeyer et al., 2000) (Abb. 1).

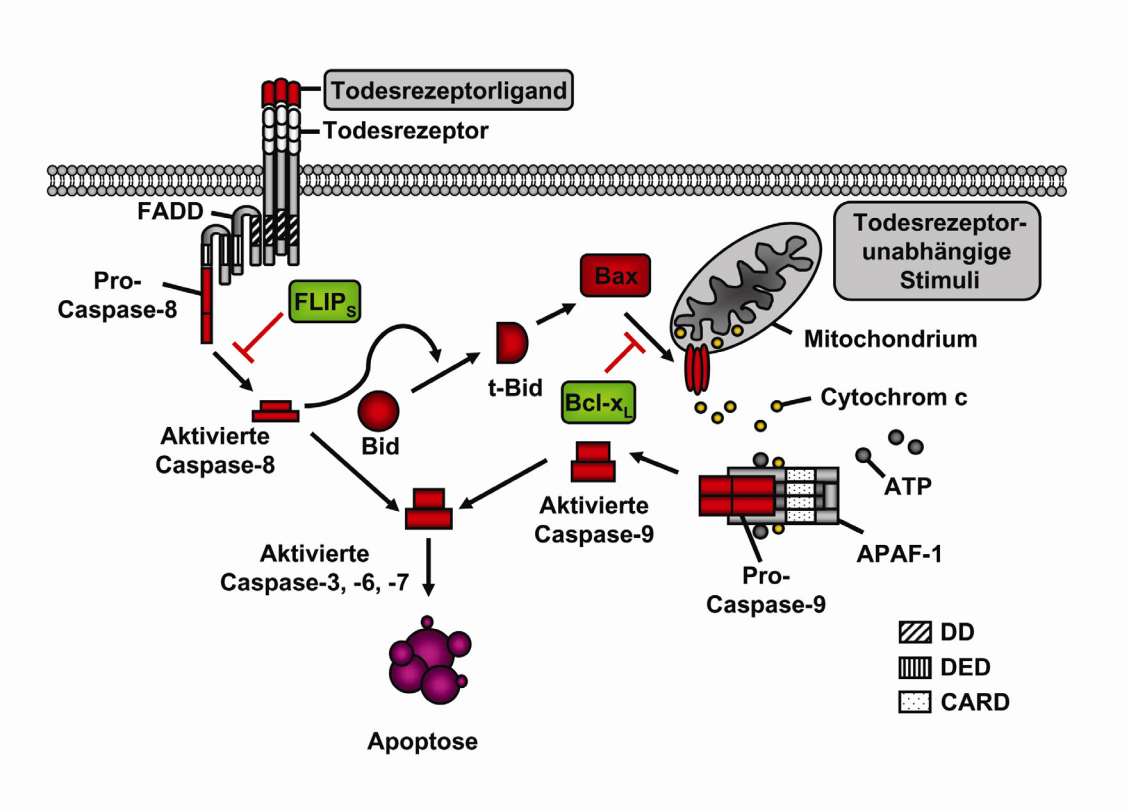

Abb. 1: Signalwege des progammierten Zelltods.
Apoptose kann durch zwei wesentliche Signalwege induziert werden. Beim extrinsischen Todespfad kommt es durch Ligation eines Todesrezeptors, z.B. CD95/Fas/APO-1 oder TRAIL-Rezeptor-1 (DR4) zur Trimerisierung des Rezeptors mit anschließender Bindung des Adapterproteins FADD über eine Todesdomäne (DD). Die FADD-vermittelte Rekrutierung der Procaspase-8 über die Todeseffektordomäne (DED) komplettiert den DISC und ermöglicht die Aktivierung der Initiatorcaspase-8. Diese spaltet anschließend die Effektorcaspasen-3, -6 und -7, die wiederum die Endstrecke der Apoptose einleiten. Im Rahmen des intrinsischen Signalwegs induzieren todesrezeptorunabhängige Stimuli den Ausstrom von Cytochrom c in das Zytosol. Cytochrom c bildet mit APAF-1 und Procaspase-9, streng ATP-abhängig, das Apoptosom. Caspase-9 bindet hierbei über eine Caspasenrekrutierungsdomäne (CARD) an APAF-1. Die Bildung des Apoptosoms induziert die Spaltung der Initiatorcaspase-9, die ihrerseits die Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 vermittelt. Der extrinsische und der intrinsische Apoptoseweg sind durch das Bcl-2-Familienmitglied Bid miteinander verbunden. Aktivierte Caspase-8 spaltet Bid und trunkiertes Bid (t-Bid), induziert beispielsweise über die Aktivierung des Bcl-2-Familienmitglieds Bax den intrinsischen Apoptosepfad. FLIP$_S$ inhibiert den extrinsischen Apoptoseweg durch Hemmung der Caspase-8 Spaltung, während Bcl-x$_L$ den intrinsischen Apoptosepfad durch Blockade der Bax-Aktivierung hemmt.

Abhängig vom Zelltyp wird nach Ligation eines Todesrezeptors primär der extrinsische Apoptoseweg oder der extrinsische und der intrinsische Zelltodpfad aktiviert. Bei Typ-I-Zellen wird ausreichend Caspase-8 gespalten, um eine direkte Aktivierung der Effektorcaspasen zu ermöglichen. Bei Typ-II-Zellen reicht die Menge gespaltener Caspase-8 hierzu nicht aus. Über die Spaltung von Bid und die anschließende Aktivierung des intrinsischen Apoptosepfads kommt es bei diesen Zellen zu einer Ampilfikation des Zelltodsignals durch das Mitochondrium. Während es auch bei Typ-I-Zellen zu einer Spaltung von Bid kommt, ist dies im Gegensatz zur Situation bei Typ-II-Zellen nicht zur

Durchführung der Apoptose notwendig. Entsprechend kann in Typ-II-Zellen, aber nicht in Typ-I-Zellen, Bcl-2 oder Bcl-x_L Überexpression vor CD95/FAS-vermittelter Apoptose schützen (Luo et al., 1998; Scaffidi et al., 1998). Frisch aktivierte T-Zellen verhalten sich wie Typ-II-Zellen, wohingegen längere Kultur mit IL-2 T-Zellen zunehmend in Typ-I-Zellen transformiert (Peter et al., 1997; Schmitz et al., 2003).

2.2.3 Induktion und Hemmung des aktivierungsinduzierten Zelltods

Während einer Immunantwort kann die Verdopplungzeit antigenspezifischer T-Lymphozyten mitunter nur viereinhalb Stunden betragen. Nach Beendigung der Immunantwort stirbt jedoch ein Großteil der zuvor expandierten T-Zellen, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt. Die Zerstörung dieser zuvor expandierten T-Zellen bezeichnet man als aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD). AICD wird in T-Zellen einerseits über die Ligation von Todesrezeptoren, insbesondere CD95/Fas und in geringerem Maße TNFR sowie andererseits durch Wachstumsfaktormangel induziert (Green et al., 2003; Krueger et al., 2003). CD95/Fas-vermittelter AICD erfolgt als Suizid oder Fraternizid, je nachdem ob sich CD95L/FasL und CD95/Fas auf der gleichen oder auf unterschiedlichen T-Zellen befinden (Krammer, 2000). Auch nicht-lymphatische Zellen sind in der Lage CD95L/FasL zu expimieren und AICD bei aktivierten T-Zellen zu induzieren. Aktivierte T-Zellen sind wesentlich empfindlicher für CD95/Fas-vermittelten AICD als ruhende T-Lymphozyten (Wesselborg et al., 1993). Der autokrine T-Zellwachstumsfaktor IL-2 induziert bei aktivierten T-Zellen die Heraufregulation von CD95L/FasL und CD95/Fas sowie die Herunterregulation von c-$FLIP_L$ (Refaeli et al., 1998; Scaffidi et al., 1999). Die IL-2-vermittelte Herunterregulation von $FLIP_L$ wurde allerdings nicht generell beobachtet (Scaffidi et al., 1999).

Im Rahmen von *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass die CD3-Ligation bei T-Effektorzellen AICD ausgelöst. Hingegen hemmt die gleichzeitige Kostimulation über CD28 den AICD (Daniel et al., 1997; Daniel et al., 1998). Die Ligation des CD28-Moleküls vermittelt die Aktivierung der PI3-Kinase (Prasad et al., 1994) mit anschließender Generation des Signalmoleküls Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP_3), das verschiedene Kinasen, darunter die AKT/PKB aktiviert (Kane et al., 2001; Parry et al., 1997). AKT/PKB ist eine Serin/Threonin-Kinase, die u.a. das proapoptotische Bad hemmt und unterschiedliche

Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF-κB kontrolliert (Jones et al., 2000; Kane et al., 1999; Ozes et al., 1999; Romashkova und Makarov, 1999). Publizierte Daten zeigen, dass NF-κB und AKT/PKB an der Heraufregulation der antiapoptotischen Proteine, $FLIP_S$ und Bcl-x_L, im Rahmen der CD28-vermittelten Hemmung des AICD, beteiligt sind (Boise et al., 1995; Kirchhoff et al., 2000a). Neben der Aktivierung des PI3-Kinase-AKT-Signalwegs wurde die CD28-vermittelte Aktivierung der GTPasen Rac und CDC42 über Grb2, SLP-76 und Vav beschrieben (Reif und Cantrell, 1998). Die genaue Interaktion der verschiedenen Signalwege ist noch weitgehend unklar.
Obwohl die Rolle kostimulatorischer Signale bei der Hemmung des AICD gut belegt ist, muss einschränkend erwähnt werden, dass in einem tierexperimentellen Modell gezeigt wurde, dass bei TCR-Ligation mit einem Peptid mit sehr hoher TCR-Bindungsstärke ein derart starkes TCR-Signal generiert wurde, dass die zusätzliche Ligation von CD28 die T-Zellen nicht vor Apoptose schützte, sondern vielmehr in diesen T-Lymphozyten Apoptose induzierte (Yu et al., 2003). Diese Beobachtung unterstützt jedoch aus unserer Sicht das Konzept nachdem die gemeinsame Stärke von TCR- und Kostimulationssignal über das weitere Schicksal der T-Zelle im Bezug auf Anergie, Expansion oder Deletion entscheiden.

2.2.4 Kostimulationsfamilien

Kostimulationsrezeptoren finden sich im wesentlichen in zwei Proteingenfamilien, der Immunglobulin (Ig)-Genfamilie und der TNFR-Genfamilie. Während CD28, ICOS (inducible costimulator), CD152/CTLA-4 und CD2/LFA-2 Vertreter der Ig-Genfamilie sind, zählen CD137/4-1BB, CD134/OX40, CD27, CD30 und HEVM (herpes-virus entry mediator) zu den kostimulatorischen Mitgliedern der TNFR-Genfamilie. Mitglieder der Ig-Genfamilie sind durch eine gemeinsame Immunglobulinhomologieregion gekennzeichnet. CD28, der am besten untersuchte Vertreter der Ig-Genfamilie, wird auf nahezu allen $CD4^+$-T-Zellen und etwa 50% der humanen $CD8^+$-T-Zellen exprimiert. Die Ligation von CD28, bei gleichzeitigem TCR-Signal, aktiviert eine Reihe von T-Zelleffektorfunktionen, u.a. die Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen sowie die Heraufregulation von Zytokin- und Chemokinrezeptoren und die Expression weiterer Kostimulationsmoleküle, wie etwa ICOS, CD134/OX40 und CD137/4-1BB (Acuto und Michel, 2003). CD28 bindet an CD80/B7.1 und/oder CD86/B7.2 auf APC (Lenschow et al., 1996; Sharpe und Freeman, 2002). CD86 wird in geringem Maße, konstitutiv auf den meisten APC exprimiert, während

CD80 nicht auf ruhenden APC nachweisbar ist. Nach Aktivierung durch inflammatorische Zytokine oder T-Zellkontakt werden beide Moleküle auf APC heraufreguliert. Das Expressionsmaximum wird für CD86 etwa 24 Stunden und für CD80 48 bis 72 Stunden nach Aktivierung erreicht (Hathcock et al., 1994; Lenschow et al., 1993). Es ist unklar, ob CD80 und CD86 redundante Funktionen haben. Während einige Autoren hiervon ausgehen (Lanier et al., 1995; Natesan et al., 1996), beobachteten andere Gruppen Unterschiede zwischen CD80- und CD86-vermittelten Signalen (Freeman et al., 1995; Kuchroo et al., 1995; Lenschow et al., 1995). So konnte bei Mäusen mit EAE gezeigt werden, dass Antikörper gegen CD80 die Schwere der Erkrankung verminderten und zur Induktion antiinflammatorischer Zytokine führten, während Antikörper gegen CD86 eine Verschlechterung der EAE induzierten (Kuchroo et al., 1995). Dem entsprechend konnte in einer Arbeit im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen mit humanen Zellen gezeigt werden, dass CD86, nicht aber CD80, in erster Linie eine Th0/Th2-Antwort mit Sekretion von IL-4 induziert (Freeman et al., 1995).

Im Gegensatz zu CD28 wird CD152/CTLA-4 erst nach T-Zellaktivierung, dann jedoch in gleichem Maße sowohl auf $CD4^+$- als auch auf $CD8^+$-T-Lymphozyten exprimiert. CD152/CTLA-4 bindet mit 20- bis 50-fach höherer Affinität als CD28 an CD80 und CD86, vermittelt aber im Gegensatz zu CD28 ein hemmendes Signal und ist sehr wahrscheinlich an der Beendigung der T-Zellantwort beteiligt, indem es u.a. die CD3/CD28-induzierte Sekretion des IL-2 und die Zellzyklusprogression blockiert (Krummel und Allison, 1996; Walunas et al., 1994). Während ein Signal über CD28 die Schwelle für die TCR-vermittelte Aktivierung der T-Zelle senkt, hebt ein Stimulus über CD152/CTLA-4 diese Schwelle an. Das Protein Cbl-b spielt hierbei eine zentrale Rolle. CD28-vermittelte Kostimulation verstärkt den TCR-induzierten Abbau des Cbl-b, während Signale über CD152/CTLA-4 die Expression des Cbl-b verstärken. Cbl-b-defiziente T-Zellen proliferieren dementsprechend nach Stimulation mit einem anti-CD3-Antikörper, ohne dass CD28- oder CTLA-vermittelte Signale die Proliferation verstärken oder hemmen können (Li et al., 2004).

Die Mitglieder der TNFR-Genfamilie CD134/OX40, CD137/4-1BB, CD27, CD30 und HVEM sind Typ-I-Membranproteine mit cysteinreichen, extrazellulären Domänen. Anders als die Todesrezeptoren der TNFR-Genfamilie (z.B. CD95/FAS und TRAIL-R1 oder -2) besitzen sie keine intrazelluläre Todesdomäne und interagieren nicht mit dem Adapterprotein FADD. Die Liganden der TNFR-Moleküle OX40 Ligand (OX40L), 4-1BBL, CD70, CD153/CD30L und LIGHT sind Typ-II-Transmembranproteine und besitzen eine TNF-

Homologiedomäne am C-Terminus, die an der Bindung an die TNFR-Moleküle beteiligt ist (Croft, 2003). Das TNFR-Mitglied CD137/4-1BB wird nach Aktivierung auf T-Zellen, dendritischen Zellen (DC) und B-Zellen exprimiert. Der Ligand 4-1BBL wird auf aktivierten DC, Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen nachgewiesen (Alderson et al., 1994; Croft, 2003). Während frühere Untersuchungen ergaben, dass CD137/4-1BB in erster Linie $CD8^+$-T-Zellen kostimuliert, zeigen neuere Untersuchungen, dass $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen in gleichem Maße durch CD137/4-1BB aktiviert werden (Cannons et al., 2001; Wen et al., 2002). CD137/4-1BB induziert T-Zellproliferation, -differenzierung und AICD-Hemmung (Alderson et al., 1994; Hurtado et al., 1997; Saoulli et al., 1998; Wen et al., 2002). Während CD28-vermittelte Signale eine wesentliche Rolle bei der frühen primären T-Zellaktivierung spielen, scheinen CD137/4-1BB-vermittelte Signale wichtiger bei der späten primären und der sekundären T-Zellantwort zu sein (Bertram et al., 2004; Croft, 2003; Dawicki und Watts, 2004).

Auf molekularer Ebene führt die Ligation von CD137/4-1BB zur Rekrutierung der TNFR-assoziierten Faktoren (TRAF)-1, -2 und -3 (Croft, 2003). Der CD137/4-1BB-TRAF-Komplex vermittelt die Aktivierung der stressaktivierten Proteinkinase (SAPK/JNK), der p38 mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK), der extrazellulär regulierten Kinase (ERK), des Transkriptionsfaktors NF-κB sowie einiger Proteine des TCR-Signalwegs (Lck, pTyr, PKC-θ und SLP-70) (Arch und Thompson, 1998; Cannons et al., 1999; Lee et al., 2002; Nam et al., 2005). Hinweise auf eine Beteiligung der PI3-Kinase finden sich in der Arbeit von Lee el al. (Lee et al., 2003). Dort wurde gezeigt, dass CD137/4-1BB-vermittelte Signale zur Heraufregulation der Zellzyklusregulatoren Cyclin-D2, -D3 und –E und zur Herunterregulation von $p27^{kip1}$ über einen ERK1/2- und PI3-Kinase-abhängigen Signalweg führen (Lee et al., 2003). An anderer Stelle demonstrierte diese Arbeitsgruppe, dass CD137/4-1BB die Expression der antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder Bcl-x_L und Bfl-1 induziert (Lee et al., 2002).

2.2.5 T-Zellaktivität bei Autoimmunerkrankungen am Beispiel der multiplen Sklerose

Neben ihrer Funktion als Effektoren der adaptiven, zellulären Immunantwort, spielen T-Zellen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Multiple Sklerose (MS) ist eine inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems mit charakteristischer Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigung.

Obwohl die Ätiologie letztlich noch nicht geklärt ist, unterstützen die Zusammensetzung der Entzündungsherde, der immunogenetische Hintergrund, die Reaktion auf Immunmodulation und Daten aus Tiermodellen die Vorstellung, dass MS eine Autoimmunerkrankung ist. Man nimmt an, dass bei der Genese der Erkrankung insbesondere MBP- oder PLP-spezifische $CD4^+$-T-Zellen eine wesentliche Rolle spielen (Madsen et al., 1999; Sospedra und Martin, 2005). Die Evidenz für eine T-zellvermittelte Genese der MS ist jedoch indirekt und die herausragende Bedeutung dieser Zellen für die Pathogenese wird von einigen Autoren angezweifelt (Hohlfeld und Wekerle, 2004).

MBPp85-99 ist eines der immundominanten Epitope des MBP und wird als ein Kandidatenantigen der MS angesehen (Krogsgaard et al., 2000; Martin et al., 1992; Ota et al., 1990). Erste Analysen der Frequenzen MBP- oder PLP-spezifischer T-Zellen ergaben für MS-Patienten und für Kontrollpersonen ähnliche Häufigkeiten, obwohl sich bei den Gesunden kein Hinweis auf eine MS Erkrankung fand (1 in 10^5 bis 10^6 T-Lymphozyten) (Martin et al., 1990; Ota et al., 1990). Die zunächst beunruhigende Erkenntniss, dass autoreaktive T-Zellen in jedem menschlichen Körper vorhanden sind, ist mittlerweile der Einsicht gewichen, dass Autoreaktivität kein generell pathologisches Phänomen ist, sondern eine essentielle Komponente des gesunden Immunsystems darstellt und möglicherweise sogar protektive Funktionen hat (Kerschensteiner et al., 2003; Moalem et al., 1999).

Weitere Untersuchungen bezüglich der autoreaktiven T-Zellen bei MS-Patienten und Kontrollpersonen stellten eine Reihe von Unterschieden fest. So wiesen MBP-spezifische T-Zellen MS-kranker Patienten häufiger HPRT (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase Reporter)-Genmutationen auf, als dies bei T-Zellen dieser Art in Gesunden der Fall war. Dies suggerierte, dass MBP-spezifische T-Zellen bei MS-Kranken bereits proliferiert hatten (Allegretta et al., 1990). Als weiteren Hinweis auf eine Aktivierung der MBP-spezifischen T-Zellen bei MS-Patienten wurde die verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers IL-2-Rezeptor (IL-2R) gedeutet (Zhang et al., 1994). Die Untersuchung der mRNA für die CDR3-Region eines bestimmten MBP-spezifischen TCR ergab bei direkter Analyse aus dem peripheren Blut eines MS-Patienten darüber hinaus eine wesentlich höhere Frequenz an MBP-spezifischen T-Zellen mit diesem bestimmten TCR (Bieganowska et al., 1997), als vorangegangene Untersuchungen vermuten ließen (Ota et al., 1990). Die Autoren ermittelten Frequenzen von einer in 300 T-Zellen (Bieganowska et al., 1997). Wir konnten gemeinsam mit einer weiteren Gruppe als erste zeigen, dass MBP-spezifische T-Zellen MS-

Kranker im Vergleich zu gesunden Personen weniger kostimulationsabhängig sind (Lovett-Racke et al., 1998; Scholz et al., 1998).

Neben der Vorstellung, dass T-Effektorzellen generell weniger Kostimulation benötigen (Croft et al., 1994; Fuchs und Matzinger, 1992; Luqman und Bottomly, 1992; Ronchese und Hausmann, 1993; Sagerstrom et al., 1993), werden aktuell zwei biologische Phänomene als mögliche Erklärungen für die verminderte Kostimulationsabhängigkeit autoreaktiver T-Zellen bei Patienten mit T-zellvermittelten Autoimmunerkrankungen diskutiert. Während bei gesunden Personen nur wenige $CD4^+$-T-Zellen CD28 negativ sind (1,31 ± 2,1%, Spannbreite 0 bis 6,25%), trifft dies bei MS-Patienten für einen wesentlich größeren Prozentsatz der Zellen zu (4,09 ± 6,94%, Spannbreite 0,012 bis 28,9%) (Markovic-Plese et al., 2001). Wiederholte Messungen ergaben darüber hinaus, dass der geringgradige Anstieg der $CD4^+CD28^-$-T-Zellen, der bei einigen gesunden Personen beobachtet wurde, ein vorübergehendes Phänomen war, während bei MS-Patienten diese Zellen wiederholt nachgewiesen werden konnten (Markovic-Plese et al., 2001). Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte ein Anstieg der $CD4^+CD28^-$-T-Zellen im Vergleich zum Normalkollektiv beobachtet werden (9,7 versus 1,7%) (Rittner et al., 1997; Schmidt et al., 1996). $CD4^+CD28^-$-T-Zellen exprimierten weder in Ruhe noch nach Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern und/oder anti-CD28-Antikörpern CD152/CTLA-4. Alternative Kostimulationsmoleküle wie CD134/OX40 konnten hingegen nachgewiesen werden. $CD4^+CD28^-$-T-Zellen gelten als Th1-Zellen, weil sie IL-2 und IFN-γ aber wenig IL-4 sezernieren. Während $CD4^+CD28^-$-T-Zellklone bereits nach alleiniger Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern proliferierten, induzierte die Zugabe von anti-CD28-Antikörpern im Vergleich zur Situation bei $CD4^+CD28^+$-T-Zellen nur einen geringen zusätzlichen Proliferationsanstieg. Entsprechend waren $CD4^+CD28^-$-T-Zellen auch weniger empfindlich für AICD-Induktion nach alleiniger CD3-Ligation. Die konstitutive FLIP-Expression in $CD4^+CD28^-$-T-Zellen, welche nach alleiniger CD3-Ligation nicht herunterreguliert wird, könnte hierfür verantwortlich sein (Vallejo et al., 2000). Des weiteren verursachte IL-2-Entzug bei $CD4^+CD28^-$-T-Zellen nur in geringem Ausmaß Apoptose. Die konstitutive Bcl-2-Expression in $CD4^+CD28^-$-T-Zellen könnte dies wiederum erklären (Schirmer et al., 1998). Die verminderte Sensitivität für Apoptosestimuli und die kostimulationsunabhängige Proliferation begünstigen mit großer Wahrscheinlichkeit die beobachtete oligoklonale Expansion der $CD4^+CD28^-$-T-Zellen *in vivo* (Schirmer et al., 1998).

Neben $CD4^+CD28^-$-T-Zellen ist in den letzten Jahren eine weitere T-Zell-Population im Zusammenhang mit der Untersuchung der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen intensiv analysiert worden. $CD4^+CD25^+$-T-Zellen wird eine regulatorische Rolle zugeschrieben, und es wird postuliert, dass diese Zellen eine bedeutende Rolle bei der Suppression autoreaktiver T-Zellen spielen (Dieckmann et al., 2001; Ehrenstein et al., 2004; Jonuleit et al., 2001; Kriegel et al., 2004; Sakaguchi, 2000; Sakaguchi et al., 1995; Viglietta et al., 2004). Das menschliche Korrelat der murinen $CD4^+CD25^+$-Zellen sind stark CD25-exprimierende $CD4^+CD25^{hoch}$-T-Zellen. Ähnlich wie in der Maus proliferieren CD4+$CD25^{hoch}$-T-Zellen *in vitro* nicht nach Antigenstimulation oder Inkubation mit anti-CD3-Antikörpern (Thornton und Shevach, 1998; Viglietta et al., 2004). Darüber hinaus unterdrücken $CD4^+CD25^{hoch}$-T-Zellen die Proliferation von $CD4^+CD25^-$-T-Zellen bei Kokultur (Baecher-Allan et al., 2001).

Nach Entdeckung dieser Eigenschaften wurde spekuliert, dass die verminderte Kostimulationsbedürftigkeit MBP-spezifischer T-Zellen MS-Kranker im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Lovett-Racke et al., 1998; Scholz et al., 1998) möglicherweise durch die verringerte Bildung oder reduzierte Aktivität der $CD4^+CD25^{hoch}$-T-Zellen bei MS-Kranken verursacht wird (Baecher-Allan und Hafler, 2004). In Einklang mit dieser Vorstellung konnte kürzlich *in vitro* die klonale Expansion humaner auto-reaktiver T-Zellen nach Deletion der $CD4^+CD25^+$-T-Zellen gezeigt werden (Danke et al., 2004).

Während die Frequenz der $CD4^+CD25^{hoch}$-T-Zellen bei Gesunden und MS-Patienten gleich hoch war, wiesen diese Zellen bei MS-Patienten eine Reduktion ihrer Suppressionseigenschaften auf (Viglietta et al., 2004). Anders als $CD4^+CD25^{hoch}$-T-Zellen gesunder Kontrollpersonen, hemmten diese Zellen bei MS-Patienten weniger effektiv die CD3-vermittelte Proliferation der $CD4^+CD25^-$-T-Zellen. Darüber hinaus inhibieren sie weniger gut die Sekretion des IFN-γ (Viglietta et al., 2004). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis findet man ähnlich defiziente $CD4^+CD25^+$-T-Zellen. Interessanterweise konnte hier die Therapie mit anti-TNF-α-Antikörpern die Suppressorfunktion der $CD4^+CD25^+$-T-Zellen verbessern (Ehrenstein et al., 2004).

2.2.6 Eigene Ergebnisse

2.2.6.1 Aktivierung MBP-spezifischer T-Zellen bei MS-Patienten in Abwesenheit kostimulatorischer Signale

Nachdem durch Klonierungsexperimente gezeigt worden war, dass auch im Blut gesunder Kontrollpersonen autoreaktive T-Zellen nachgewiesen werden konnten und zunächst vermutet wurde, dass diese in etwa gleicher Häufigkeit vorliegen (Martin et al., 1990; Ota et al., 1990), war das Ziel unserer Studie (Scholz et al., 1998) die Kostimulationsbedürfnisse autoreaktiver T-Lymphozyten MS-Kranker zu untersuchen und mit denen gesunder Kontrollen zu vergleichen. Dazu wurden chinesische Hamsterovar (CHO)-Zellen mit dem MHC-II-Molekül DRA*0101/DRB1*1501 (t-DR2) oder mit einem leeren Vektor (t-mock) transduziert. Alternativ wurden t-DR2-CHO-Zellen zusätzlich mit den Kostimulationsliganden CD80/B7.1 (t-DR2/B7.1) oder CD86/B7.2 (t-DR2/B7.2) versehen. Die unterschiedlichen CHO-Transfektanten wurden mit dem immundominanten MBP-Peptid MBPp84-102 oder einem Peptid des Tetanustoxoids (TTp830-843) beladen und nach Bestrahlung als APC eingesetzt. Alle MS-Patienten und gesunden Spender waren zu einem früheren Zeitpunkt mit Tetanustoxoid geimpft worden, so dass gegen das Peptid TTp830-843 mit großer Wahrscheinlichkeit bereits eine Immunreaktion abgelaufen war.

Vorarbeiten anderer Gruppen hatten gezeigt, dass die T-Zellaktivierung durch das Gedächtnisantigen Tetanustoxoid auch in Abwesenheit von Kostimulationssignalen zu einer Immunantwort führt. Hierauf aufbauend wurden in unserer Studie $CD4^+$-T-Zellen durch negative Selektion mit hoher Reinheit (>97%) aus dem peripheren Blut der MS-Patienten und gesunden Spender gewonnen und in Versuchen eingesetzt. Die aufgereinigten $CD4^+$-T-Zellen erhielten drei aufeinander folgende Stimulationen mit dem gleichen CHO-Zelltyp und dem gleichen Peptid. Während der letzten Simulation wurden die T-Zellen aufgeteilt und in Gegenwart oder Abwesenheit dieses Peptids restimuliert. Auf diese Weise identifizierten wir antigenspezifische, klonal expandierte T-Lymphozyten. Wie erwartet, konnte bei gesunden Spendern eine antigenspezifische, kostimulationsunabhängige T-Zellproliferation gegen TTp830-843, nicht aber gegen MPBp85-99, nachgewiesen werden. Bei vorhandener Kostimulation durch Einsatz von t-DR2/B7.1- oder t-DR2/B7.2-Zellen wurde hingegen bei gesunden Spendern sowohl gegen TTp830-843 als auch gegen MBPp85-99 eine antigenspezifische T-Zellantwort festgestellt. Diese Ergebnisse zeigten erneut, dass in gesunden Spendern autoreaktive T-Zellen vorhanden sind. Diese MBP-spezifischen T-Zellen

wurden mit großer Wahrscheinlichkeit bisher jedoch *in vivo* noch nicht aktiviert und benötigen daher zur Aktivierung neben einem antigenspezifischen TCR Signal auch ein kostimulatorisches Signal. Im Gegensatz hierzu konnten bei einem Großteil der Patienten mit MS sowohl gegen TTp830-843 als auch gegen MBPp85-99 spezifische T-Zell-Linien in Abwesenheit von Kostimulation generiert werden (Abb. 2).

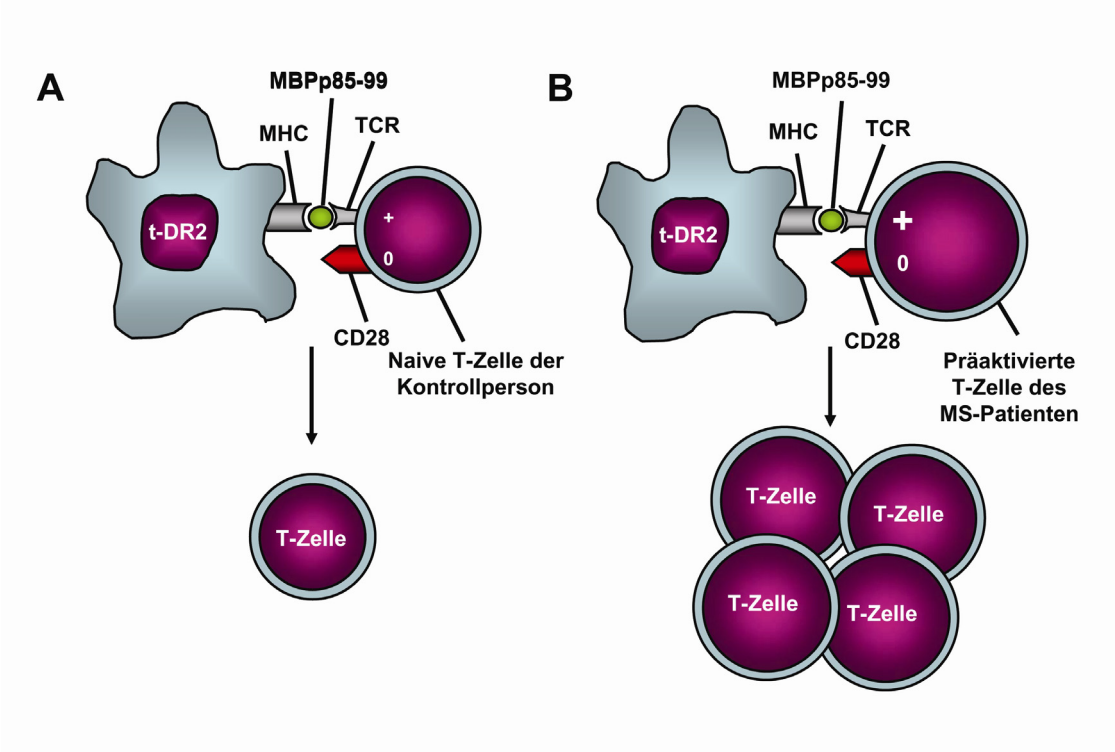

Abb. 2: Präaktivierte T-Zellen proliferieren antigenspezifisch ohne ein kostimulatorisches Signal.
(A) MBPp85-99-spezifische T-Zellen der Kontrollpersonen expandierten nicht nach Stimulation mit MBPp85-99-beladenen CHO-Zellen, die lediglich MHC-II, aber nicht die Kostimulationsliganden CD80/B7.1 oder CD86/B7.2, exprimierten (t-DR-2). (B) Hingegen expandierten MBPp85-99-spezifische T-Zellen von MS-Patienten nach Kokultur mit t-DR2-CHO-Zellen. Sowohl T-Zellen von Kontrollpersonen als auch von MS-Patienten expandierten kostimulationsunabhängig bei Aktivierung mit dem Gedächtnisantigen Tetanustoxoid (TTp830-843). MBPp85-99 ist für MS-Patienten, nicht jedoch für Kontrollpersonen, ein Gedächtnisantigen (recall antigen).
+: in die Zelle übertragenes Aktivierungssignal, 0: fehlendes Signal, hier über CD28. Der vermutlich stärkere Stimulus über den TCR der T-Effektorzelle des MS-Patienten wird durch ein größeres ‚+' symbolisiert.

Eine generelle Kostimulationsunabhängigkeit der $CD4^+$-T-Zellen MS-Kranker wurde durch die fehlende Aktivierbarkeit der gesamten T-Zellen durch alleinigen Einsatz eines anti-CD3-Antikörpers ausgeschlossen. Um in unserer damaligen Studie auszuschließen, dass MBPp85-99-spezifische T-Zellen ein kostimulatorisches Signal durch Ligation an CD80 oder CD86 auf T-Zellen erhielten, wurden diese Moleküle mit einem Fusionsprotein des CD152/CTLA-4

(CTLA-4-Ig) blockiert, ohne dass dies einen Einfluss auf die klonale Expansion MBPp85-99-spezifischer T-Zellen bei MS-Patienten hatte.
Wir konnten somit zeitgleich mit Lovett-Racke et al. (Lovett-Racke et al., 1998) als erste Gruppen zeigen, dass MBPp85-99-spezifische $CD4^+$-T-Zellen MS-Kranker in Abwesenheit von Kostimulation klonal expandieren und sich daher sehr wahrscheinlich in einem präaktivierten Zustand befinden. MBPp85-99 ist daher für die Mehrzahl der von uns untersuchten MS-Patienten ein Gedächtnisantigen (recall antigen).

2.2.6.2 T-Zellen exprimieren eine hypoglykosilierte Form des CD86, welche nicht an CD28 bindet

Die zuvor beschriebene Expression von CD86 auf T-Lymphozyten war Gegenstand der im Folgenden erläuterten Studie (Höllsberg et al., 1997). Während ruhende T-Zellen weder CD80 noch CD86 exprimieren, findet man auf aktivierten T-Zellen zunächst CD86 und zeitlich verzögert CD80 (June et al., 1994). Obwohl aktivierte T-Zellen nicht zu den klassischen APC gerechnet werden, können sie neben MHC-I, das, den APC vorbehaltene, MHC-II exprimieren. T-Zellen sind in der Lage, Proteine zu prozessieren und Peptide zu präsentieren, allerdings scheint die Antigenaufnahme im Vergleich zu den klassischen APC wesentlich reduziert (Lanzavecchia et al., 1988).
Um die Fähigkeit von T-Zellen zur Kostimulation in einer T-Zell-T-Zellinteraktion zu überprüfen, wurden ruhende und antigenaktivierte Zellen eines MBP-spezifischen T-Zellklons ionisierend bestrahlt, mit MBPp84-102 beladen und als APC eingesetzt (T-Zell-APC). Trotz der ausgeprägten Expression von CD86 und in geringerem Umfang von CD80, waren die T-Zell-APC in ruhendem Zustand nicht und nach Aktivierung mit anti-CD3-Antikörpern nur in geringem Maße zur Stimulation des MBP-spezifischen T-Zelleffektorklons fähig. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Stimulation der T-Zell-APC mit anti-CD3-Antikörpern die Heraufregulation von CD58/LFA-3 induzierte. CD58/LFA-3 ist ein Protein, das ubiquitär auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Sein Ligand CD2/LFA-2, ein Mitglied der Ig-Genfamilie, kann außer an CD58 noch an CD48 und CD59 binden. Die Ligation von CD2 vermittelt ein kostimulatorisches Signal, oder kann sogar antigen- bzw. TCR-CD3-unabhängig T-Zellaktivierung und -differenzierung induzieren (Meuer et al., 1984; Ohno et al., 1991; Sanchez-Madrid et al., 1982). Entsprechend ließ sich

der stimulatorische Effekt der T-Zell-APC auf den T-Zelleffektorklon durch einen blockierenden anti-CD58-Antikörper vollständig hemmen.

Um die Ursache der fehlenden kostimulatorischen Fähigkeit des auf aktivierten T-Zellen exprimierten CD86 weiter zu untersuchen, wurde CD86 aus aktivierten T-Zellen mit diesem Molekül aus transduzierten CHO-Zellen oder EBV-immortalisierten B-Zellen im Western-blot verglichen. Interessanterweise fanden wir für CD86 aus T-Zellen ein vergleichsweise geringeres Molekulargewicht. Die Sequenzierung der CD86-mRNA ergab keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Sequenz, beispielsweise durch alternatives Gen-Splicing. Hingegen demonstrierte die Behandlung des Zell-Lysats mit PNGaseF, einer Glykosidase, dass CD86 in T-Zellen im Vergleich zu CD86-transfizierten CHO-Zellen eine geringere Glykosylierung aufweist.

Bindungstests zeigten im weiteren, dass CD86 und CD80 auf T-Zellen in wesentlich geringerem Umfang an Fusionsproteine des CD28 (CD28-Ig) und des CD152/CTLA-4 (CTLA-4-Ig) binden als CD86 und CD80 auf EBV-immortalisierten B-Zellen oder CD86 auf transduzierten CHO-Zellen (t-DR2/B7.2). Während nahezu keine Bindung an CD28 nachweisbar war, konnten wir eine Restbindung an das inhibitorische CD152/CTLA-4 demonstrieren (Abb. 3). Die verbliebene Bindungsaktivität von CD86 auf T-Zellen für CD152/CTLA-4 ist insbesondere interessant, weil gezeigt werden konnte, dass CD86 auf frisch isolierten murinen T-Zellen partiell die T-Zellproliferation inhibiert. Diese Inhibition scheint CD152/CTLA-4-vermittelt zu sein (Krummel und Allison, 1995). Eine verminderte CD28-induzierte Kostimulationsaktivität, bei erhaltener CD152/CTLA-4-Bindungsaktivität, konnte auch für CD86, das auf murinen T-Zellen exprimiert wird, nachgewiesen werden (Greenfield et al., 1997).

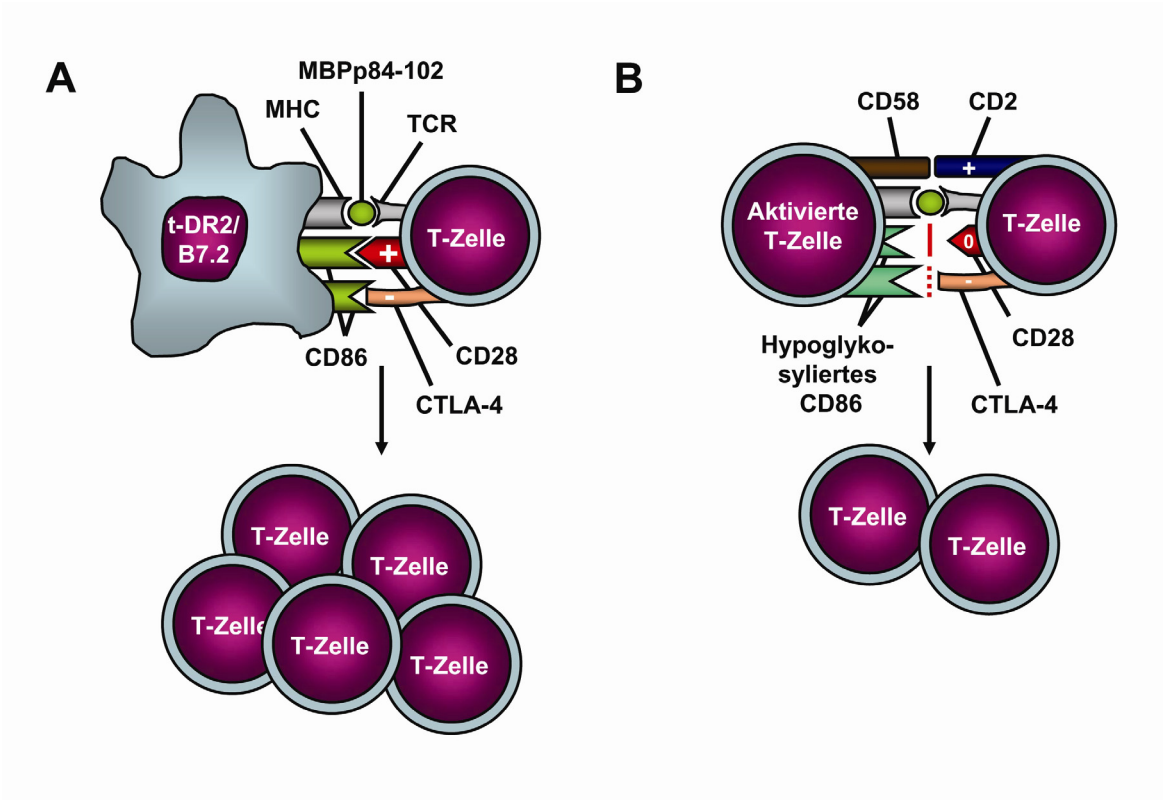

Abb. 3: Aktivierte T-Zellen sind nur in begrenztem Umfang in der Lage, T-Lymphozyten antigenspezifisch zu stimulieren.
(A) Antigenbeladene MHC-II- und CD86/B7.2-transduzierte CHO-Zellen (t-DR2/CD86) induzierten über die Bindung an den TCR und das Kostimulationsmolekül CD28 auf T-Zellen antigenspezifische T-Zellproliferation. Die Ligation von CD28 über CD86/B7.2 vermittelte ein Kostimulationssignal, dass durch ein schwächeres, inhibierendes Signal über CTLA-4 nicht gehemmt wurde (B). Obwohl CD86/B7.2 in erheblichem Maße auch auf aktivierten T-Zellen nachgewiesen wurde, kam es zu keiner Bindung an CD28 und, im Vergleich zu t-DR2/CD86-Zellen, zu einer verminderten Bindung an CD152/CTLA-4. Im Gegensatz zu CD86/B7.2 auf t-DR2/B7.2-CHO-Zellen oder EBV-immortalisierten B-Zellen ist CD86/B7.2 auf aktivierten T-Zellen hypoglykosyliert. Die Fähigkeit aktivierter T-Zellen, ruhende T-Zellen in begrenztem Umfang antigenspezifisch zu aktivieren, wurde durch die Bindung von CD58/LFA-3 an CD2/LFA-2 unterstützt.
+: in die Zelle übertragenes Aktivierungssignal, 0: fehlendes Signal, -: hemmendes Signal. Die Größe des ‚+'-Zeichens korreliert mit der Stärke des Signals.

Wir konnten somit zeigen, dass die Kapazität aktivierter T-Zellen, wie APC zu agieren, einerseits durch die aktivierungsinduzierte Expression von CD58, das an CD2 bindet, befördert wird, aber anderseits durch die verbliebene Bindung von CD86 und CD80 an CD152/CTLA-4, bei fehlender Bindung an CD28, begrenzt wird. Auf diese Weise wird möglicherweise eine laufende Immunreaktion unterstützt, während die Gefahr einer Autoimmunreaktion dadurch begrenzt wird, dass ruhende T-Zellen trotz etwaiger Expression von CD86/CD80 nicht in der Lage sind, als APC zu fungieren. Diese Hypothese wird durch neuere Ergebnisse unterstützt, die zeigen, dass die konstitutive CD86/B7.2-Expression auf T-Zellen im Tierversuch zu einer wesentlichen Reduktion der GvHD nach allogener Stammzelltransplantation führt (Greenwald et al., 2005).

2.2.6.3 Aktivierung HTLV-1-infizierter T-Zellen in Abwesenheit kostimulatorischer Signale

Nachdem wir zeigen konnten, dass MBP-spezifische T-Zellen MS-Kranker auch ohne Kostimulation aktiviert werden können, war das Ziel der folgenden Studie (Scholz et al., 1996a), die Kostimulationsbedürfnisse HTLV-1 (humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ-I)-infizierter T-Zellen zu untersuchen.

In ungefähr 5% der Patienten mit HTLV-1-Infektion findet man eine chronische Myelopathie oder ein adultes T-Zell-Lymphom (ATL). Darüberhinaus sind inflammatorischen Erkrankungen wie Arthritis oder Uveitis in Folge einer HTLV-1-Infektion beschrieben worden (Höllsberg und Hafler, 1993). Bei HTLV-1-Patienten mit chronischer Myelopathie findet man typischerweise eine Rückenmarksdemyelinisierung und inflammatorische Rückenmarksinfiltrate mit einer großen Anzahl $CD8^+$-T-Zellen. Bis zu 10% der peripheren T-Zellen sind mit dem Virus infiziert (Richardson et al., 1990). Des weiteren können zytotoxische T-Zellen mit Spezifität für das *tax*-Protein des HTLV-1-Virus nachgewiesen werden (Elovaara et al., 1993). Eine Hypothese bezüglich der Pathogenese der Myelopathie geht davon aus, dass MBP-spezifische T-Zellen zufällig infiziert werden und anschließend im ZNS, gewebespezifisch, Zellen abtöten (Höllsberg und Hafler, 1993).

Um die Kostimulationsbedürfnisse HTLV-I-infizierter T-Zellen zu untersuchen, wurde ein MBPp84-102-spezifischer $CD4^+$-T-Zellklon durch Kokultur mit einem HTLV-1-produzierenden T-Zellklon infiziert. Die erfolgreiche Infektion wurde durch Nachweis der viralen *tax/rex*-mRNA gezeigt. Der HTLV-1-infizierte T-Zellklon war nicht immortalisiert, sondern musste periodisch mit Phytohämagglutinin (PHA) und mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) restimuliert werden. Um die Notwendigkeit kostimulatorischer Signale bei der antigenspezifischen Aktivierung des HTLV-1-infizierten T-Zellklons zu untersuchen, wurden wiederum die mit dem MHC-II Molekül DRA*0101/DRB1*1501 transduzierten CHO-Zellen verwandt (t-DR2). CHO-Zellen wurden alternativ nur mit dem leeren Vektor (t-mock) oder zusätzlich mit einem Vektor für CD80 (t-DR2/B7.1) oder CD86 (t-DR2/B7.2) transfiziert. Während der nicht-infizierte Mutterklon nur nach Kokultur mit MBPp84-102-beladenen t-DR2/B7.1- oder t-DR2/B7.2-Zellen aktiviert wurde, konnte der HTLV-1-infizierte T-Zellklon auch durch MBPp84-102-beladene t-DR2-Zellen stimuliert werden. Des weiteren hemmte der Einsatz blockierender Antikörper gegen CD80 und CD86

die t-DR2/B7.1- bzw. die t-DR2/B7.2-induzierte Proliferation des nicht-infizierten T-Zellklons wesentlich stärker als die des HTLV-1-infizierten T-Zellklons. Schließlich konnten wir zeigen, dass die Sekretion des IL-5 und IFN-γ in HTLV-1-infizierten T-Zellen nahezu kostimulationsunabhängig erfolgte, während die Sekretion des antiinflammatorischen IL-4 wesentlich durch gleichzeitige Expression eines Kostimulationsliganden auf den CHO-Zellen gesteigert werden konnte. In nicht-infizierten T-Zellen war hingegen die Sekretion aller drei Zytokine kostimulationsabhängig und auch bei vorhandener Kostimulation sezernierte der HTLV-1-infizierte T-Zellklon wesentlich größere Mengen IL-5 und IFN-γ als der nicht-infizierte Klon.

Um die Kostimulationsunabhängigkeit der HTLV-1-infizierten T-Zellen weiter zu untersuchen, setzten wir blockierende Antikörper gegen CD80/B7.1 und CD86/B7.2 ein. Während die durch peptidbeladene t-DR2-, t-DR2/B7.1- oder t-DR2/B/.2-Zellen induzierte Proliferation und IL-5- sowie IFN-γ-Sekretion der HTLV-1-infizierten T-Zellen hierdurch nicht gehemmt wurde, wurden diese Effektorfunktionen bei nicht-infizierten T-Zellen wesentlich vermindert.

Die weitgehende Unabhängigkeit von einer Expression des CD80 oder CD86 auf den CHO-APC legt die Vermutung nahe, dass für die Aktivierung HTLV-1-infizierten T-Zellen eine Ligation von CD28 nicht notwendig ist. Das könnte etwa zutreffen, wenn Teile des CD28-Signalwegs konstitutiv aktiviert wären. In Einklang mit dieser Hypothese konnten wir in HTLV-1-infizierten, aber nicht in nicht-infizierten T-Zellen eine geringgradige, konstitutive IL-2-mRNA-Expression nachweisen (Abb. 4).

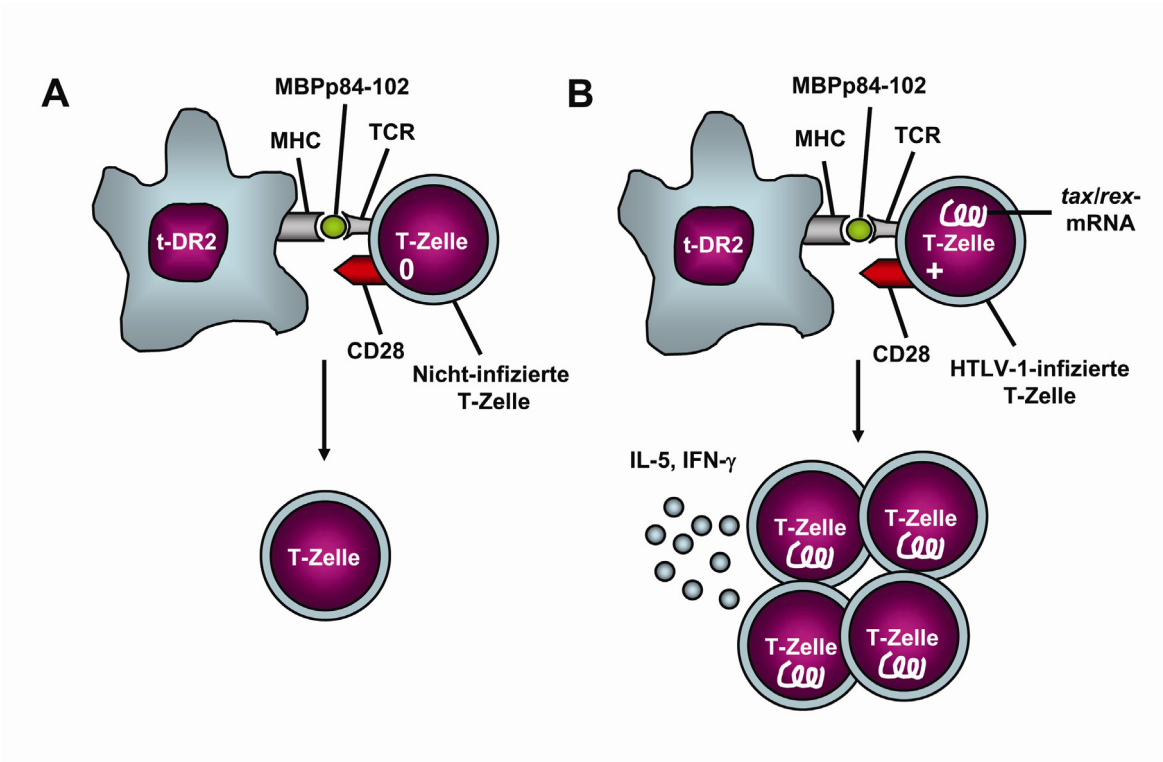

Abb. 4: HTLV-1-infizierte T-Zellen sind kostimulationsunabhängig.
(A) Ruhende T-Zellen benötigten zur antigenspezifischen Aktivierung ein Kostimulationssignal von der APC. (B) HTLV-1-infizierte T-Zellen (symbolisiert durch ‚tax/rex') proliferieren hingegen kostimulationsunabhängig und sezernieren die proinflammatorischen Zytokine IL-5 und IFN-γ. Es gibt Hinweise darauf, dass bei HTLV-1-infizierten T-Zellen der CD28-induzierte Signalweg teilweise konstitutiv aktiviert ist (symbolisiert durch ein ‚+'), während dies für nicht-infizierte T-Zellen nicht gilt (symbolisiert durch eine ‚0').

2.2.6.4 HTLV-1-Infektion verbessert die antigenpräsentierenden Eigenschaften von T-Zellen

Nachdem wir zeigen konnten, dass T-Zellen nur in sehr eingeschränktem Umfang als APC fungieren können und dass diese Fähigkeit insbesondere von einer Ligation des CD58 an CD2 abhängt (Höllsberg et al., 1997), sollte in der folgenden Studie (Scholz et al., 1996b) untersucht werden, ob die Infektion eines T-Zellklons mit HTLV-1 seine Fähigkeiten zur Antigenpräsentation verbessert. Zu diesem Zweck wurden mehrere MBPp84-102-spezifische, $CD4^+$-T-Zellklone durch Kokultur mit einem HTLV-1-produzierenden T-Zellklon infiziert. Die infizierten Subklone mussten regelmäßig mit PHA und PBMC restimuliert werden, zeigten jedoch im Gegensatz zum nicht-infizierten Mutterklon ein moderates Maß an spontaner Proliferation in Abwesenheit des exogenen Wachstumsfaktors IL-2. Die HTLV-1-infizierten T-Zellen proliferierten jedoch weiterhin MBPp84-102-spezifisch.

Während die HTLV-1-infizierten T-Zellen antigenspezifisch bei Stimulation durch MBPp84-102-beladenene t-DR2 Zellen proliferierten, war dies bei dem nicht-infizierten T-Zellklon nur bei peptidbeladenen t-DR2/B7.1 oder t-DR2/B7.2 Zellen der Fall. Neben der CD80- und CD86-unabhängigen Proliferation, sezernierten die HTLV-1 infizierten T-Zellen auch CD80- und CD86-unabhängig IFN-γ. Eine bei dem nicht-infizierten Mutterklon beobachtete, kostimulationsabhängige Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 konnte hingegen bei den HTLV-1-infizierten T-Zellen weder in Gegenwart noch in Abwesenheit kostimulatorischer Signale nachgewiesen werden.

Zellen des HTLV-1-infizierten T-Zellklons proliferierten darüber hinaus bei alleiniger Zugabe von löslichem MBPp84-102 in die T-Zellkultur in Abwesenheit von CHO-APC, während nicht-infizierte T-Zellen dazu nur in wesentlich geringerem Umfang in der Lage waren. Die antigenspezifische Proliferation der HTLV-1-infizierten T-Zellen in Abwesenheit zusätzlicher APC werteten wir als Hinweis auf die verbesserte Antigenpräsentation durch diese Zellen. Um diesen Mechanismus weiter zu untersuchen, wurden infizierte und nicht-infizierte T-Zellen mit MBPp84-102 beladen und die Fähigkeit zur Aktivierung infizierter und nicht-infizierter T-Zellen im Anschluß gemessen. Interessanterweise aktivierten HTLV-1-infizierte T-Zell-APC sowohl die infizierten als auch die nicht-infizierten T-Zellklone stärker als dies die nicht-infizierten T-Zell-APC vermochten. Auf HTLV-1-infizierten T-Zell-APC fand sich im Vergleich zu nicht-infizierten T-Zell-APC eine verstärkte Expression des MHC-II, sowie der Adhäsionsmoleküle CD54/ICAM-1 und CD58/LFA-3. Ein blockierender Antikörper gegen CD58/LFA-3 hemmte die Kapazität der HTLV-1-infizierten T-Zellen, antigenspezifisch T-Zellen zu stimulieren, wesentlich. CD58/LFA-3 wurde als Ligand des Kostimulationsmoleküls CD2/LFA-2 bereits erwähnt und die Hemmung der antigenunspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten durch HTLV-1-infizierte T Zellen durch Antikörper gegen CD58/LFA-3 wurde publiziert (Kimata et al., 1993; Wucherpfennig et al., 1992).

Zusammenfassend konnten wir mit den beiden letzten Studien zeigen, dass HTLV-1-infizierte T-Zellklone in gewissem Umfang in Abwesenheit von externem IL-2 proliferieren und eine geringgradige, konstitutive IL-2-mRNA-Expression aufweisen. Des weiteren konnten wir demonstrieren, dass HTLV-1-infizierte Zellen zur antigenspezifischen Aktivierung ihrer Effektorfunktionen kein zusätzliches kostimulatorisches Signal von einer APC benötigen, dass sie kostimulationsunabhängig die proinflammatorischen Zytokine IL-5 und IFN-γ aber nicht das antiinflammatorische IL-10 sezernieren und schließlich dass sie in der Lage sind

nicht-infizierte T-Zellen antigenspezifisch zu stimulieren. Berücksichtigt man diese unterschiedlichen Eigenschaften ist es gut vorstellbar, dass HTLV-1-infizierten T-Zellen direkt oder indirekt eine Autoimmunreaktion befördern können.

2.2.6.5 Dendritische Zellen hemmen den CD95/FAS-vermittelten AICD von T-Zellen über einen CD58-abhängigen Mechanismus

Nachdem in den vorangegangenen Arbeiten die Bedeutung kostimulatorischer Signale bei der T-Zellaktivierung analysiert wurde, sollte in der folgenden Studie (Daniel et al., 1999) untersucht werden, inwieweit DC präaktivierte T-Zellen vor CD95-vermitteltem AICD schützen können, und inwiefern kostimulatorische Signale hieran beteiligt sind. Die zu diesem Zweck *in vitro* aus PBMC generierten DC exprimierten u.a. MHC-II, die Kostimulationsliganden CD80/B7.1, CD86/B7.2 und CD58/LFA-3. PHA-P/PMA-präaktivierte T-Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart bestrahlter DC kultiviert. T-Zellapoptose wurde durch Zugabe eines agonistischen anti-CD95/Fas-Antikörpers induziert. In der Abwesenheit der DC verdoppelte die Zugabe des anti-CD95/Fas-Antikörpers die AICD-Rate präaktivierter T-Zellen im Vergleich zur Isotypen- oder Mediumkontrolle (64% versus 32% bzw. 25%). Hingegen konnte der CD95/Fas-induzierte AICD durch Zugabe von DC konzentrationsabhängig gehemmt werden. Bei einem T-Zell/DC-Verhältnis von 10 zu 1 betrug der CD95/Fas-induzierte AICD nahezu wieder den Wert der Medium- oder Isotypenkontrolle. Entsprechend konnte die im Western-blot, nach Zugabe von anti-CD95/Fas-Antikörpern, beobachtete Spaltung der Initiatorcaspase-8 und der Effektorcaspase-3, durch gleichzeitige Kokultur mit DC nahezu vollständig inhibiert werden. Um zu analysieren welche Moleküle an der Hemmung des AICD durch DC beteiligt sind, wurden den Zellkulturen blockierende Antikörpern gegen CD80/B7.1, CD86/B7.2 und/oder CD58/LFA-3 hinzugegeben. Interessanterweise inhibierte der anti-CD58-Antikörper die DC-vermittelte AICD-Hemmung am stärksten (74% des maximal möglichen AICD). Blockierende Antikörper gegen CD80/B7.1 und CD86/B7.2 zeigten einen weniger ausgeprägten Effekt. Die Kombination der drei Antikörper verursachte jedoch eine nahezu vollständige Hemmung des DC-Effektes (91% des maximal möglichen AICD).
Wir konnten somit erstmalig zeigen, dass DC *in vitro* in der Lage sind präaktivierte T-Zellen vor CD95/Fas-vermitteltem AICD zu schützen, und dass die Kostimulationsliganden CD58, CD80 und CD86 hieran beteiligt sind. Dies legt nahe, dass DC eine laufende Immunreaktion

verlängern können, auch wenn die beteiligten T-Zellen AICD-empfindlich sind und der CD95L im Überschuß vorhanden ist.

2.2.6.6 Kostimulatorische Signale über CD137/4-1BB hemmen den AICD durch Heraufregulation von Bcl-x_L und $FLIP_S$ über einen PI3-Kinase- und AKT-abhängigen Mechanismus

Nachdem bisher die Rolle der Kostimulationsliganden CD80/B7.1, CD86/B7.2 und CD58/LFA-3 Gegenstand der Untersuchungen waren, sollten in dieser Studie CD137/4-1BB-vermittelte Signale bei der Restimulation präaktivierter T-Zellen analysiert werden (Stärck et al., 2005b). Hierzu wurden Zellen der Rhabdomyosarkomzell-Linie TE671 durch Elektroporation stabil mit den Kostimulationsliganden CD80 (TE.CD80) oder CD137/4-1BB Ligand (TE.4-1BBL) transduziert. Alternativ wurden Kontrolltransfektanten generiert, die nur den leeren Vektor (TE.mock) enthielten. Anschließend wurden T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender negativ selektioniert (>95% CD3 positiv) und zunächst mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern primär stimuliert. Zum Zeitpunkt der Restimulation wurden die T-Zellen mit anti-CD3-Antikörpern in Gegenwart von TE.mock, TE.CD80 oder TE.4-1BBL Zellen reaktiviert. Die Kokultur mit TE.CD80 oder TE.4-1BBL führte im Vergleich zu TE.mock zu einem wesentlichen Anstieg der T-Zellproliferation und zu einer Hemmung des durch CD3-Ligation induzierten AICD. Wie bereits publiziert (Boise et al., 1995; Kirchhoff et al., 2000b), konnten wir als Positivkontrolle zeigen, dass die Ligation von CD28 auf der T-Zelle, in unserem Modell durch Kokultivierung mit TE.CD80, zu einer Heraufregulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-x_L und $FLIP_S$ in den T-Zellen führt. Wir zeigten des weiteren, dass, wie bereits beschrieben (Kirchhoff et al., 2000a; Kirchhoff et al., 2000b), die Ligation von CD137/4-1BB durch den Einsatz von TE.4-1BBL, eine ähnlich starke Heraufregulation von Bcl-x_L hervorruft. Darüber hinaus demonstrierten wir erstmals, dass es hierdurch zu einer vermehrten Expression von $FLIP_S$ kommt.

Da bekannt ist, dass die Ligation von CD28 zur Aktivierung der PI3-Kinase und der AKT/PKB führt (Prasad et al., 1994) und zudem die aktivierte AKT/PKB an der Regulierung von c-$FLIP_S$ beteiligt ist (Kirchhoff et al., 2000b; Skurk et al., 2004), untersuchten wir im weiteren welche Rolle diese Kinasen bei der CD137/4-1BB-vermittelten Apoptoseinhibition spielen. Hierzu wurden T-Zellen bei Reaktivierung mit steigenden Mengen des PI3-Kinaseinhibitors LY294002 kokultiviert. Wir fanden erstmalig, dass nicht nur die CD28-

sondern auch die CD137/4-1BB-vermittelte T-Zellproliferation und Hemmung des AICD durch den PI3-Kinaseinhibitor LY294002 dosisabhängig blockiert wird. Darüber hinaus hemmte LY294002 sowohl die CD28-vermittelte als auch die CD137/4-1BB-induzierte Phosphorylierung der AKT/PKB und die Hochregulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-x_L und $FLIP_S$. Um die Rolle der AKT/PKB genauer zu untersuchen, wurden T-Zellen, bei der Restimulation mit anti-CD3-Antikörpern in der Gegenwart von TE.mock, TE.CD80 oder TE.4-1BB, mit dem AKT/PKB-Inhibitor SH5 kokultiviert. Ähnlich wie LY294002 blockierte auch SH5 dosisabhängig sowohl CD28- als auch CD137/4-1BB-vermittelte T-Zellproliferation sowie AICD-Hemmung und induzierte die Herunterregulation von Bcl-x_L und $FLIP_S$ (Abb. 5).

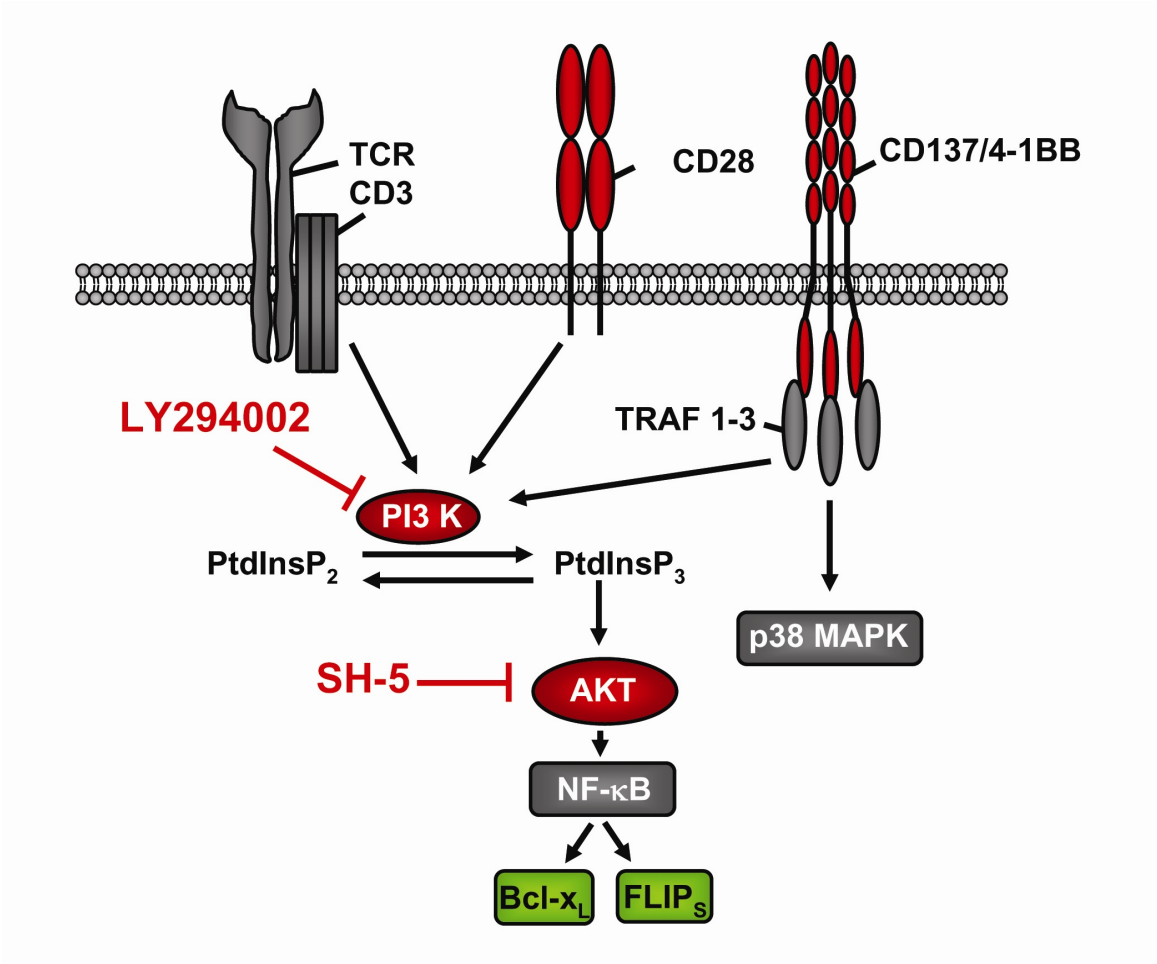

Abb. 5: CD137/4-1BB-vermittelte Signale hemmten den AICD durch Heraufregulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-x_L und $FLIP_S$.
Diese Hemmung konnte sowohl durch den PI3-Kinaseinhibitor LY294002 als auch durch den AKT/PKB-Inhibitor SH-5 blockiert werden. Für beide Kinasen war eine wesentliche Rolle bisher nur bei der CD28-vermittelten Blockade des AICD bekannt. CD137/4-1BB- und CD28-vermittelte kostimulatorische Signale haben somit eine gemeinsame Signalendstrecke.

Wir zeigten in unserer Untersuchung des weiteren, dass T-Zellen zum Zeitpunkt der Restimulation zu einem gewissen Grad durch alleinige Ligation von CD137/4-1BB in Abwesenheit eines direkten TCR/CD3-Stimulus aktiviert werden. Diese Beobachtung wird durch eine kürzlich erschienene Publikation unterstützt, in der gezeigt wurde, dass CD137/4-1BB-vermittelte Stimuli zu einer Aktivierung von Proteinen des TCR-Signalwegs führt (Nam et al., 2005).
Bisher unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen schließlich, dass CD137/4-1BB-vermittelte Signale im Vergleich zu CD28-induzierten Stimuli zu einer verlängerten Heraufregulation des $FLIP_S$ führen. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit Publikationen (Bertram et al., 2004; Croft, 2003; Dawicki und Watts, 2004), die nahe legen, dass CD137/4-1BB-vermittelte Kostimulation während der Restimulation und bei der Generation von T-Gedächtniszellen eine besondere Rolle spielt. Die Generation einer verlängerten Immunantwort ist jedoch insbesondere bei der Immunmodulation von Tumorzellen zur Induktion einer tumorspezifischen T-Zellantwort erstrebenswert.

2.2.7 T-Zellaktivierung durch Tumorzellvakzine

In den zuvor beschriebenen Arbeiten wurde die Rolle verschiedener Kostimulationsmoleküle bei der Aktivierung der Effektorfunktion und der Hemmung des AICD unterschiedlicher T-Zellpopulationen sowie der daran beteiligten Signalwege analysiert. Nachfolgend soll die Untersuchung zweier Fragestellungen beschrieben werden, die bei der Tumorzellvakzinierung mit dem Ziel der optimalen T-Zellstimulation entstehen.
Während die Rolle des Immunsystems bei der Wachstumskontrolle von Malignomen nicht uneingeschränkt bejaht wird (Qin und Blankenstein, 2004), gibt es zunehmend Hinweise, dass das angeborne (innate) und das adaptive Immunsystem in der Lage sind, Tumorzellen *in vitro* wie *in vivo* zu erkennen und unter bestimmten Umständen zu zerstören (Blattman und Greenberg, 2004; Dunn et al., 2004). Tierexperimentelle Untersuchen zeigen in diesem Zusammenhang, dass Tumorzellen malignomspezifische T-Zellen direkt oder indirekt aktivieren können (Huang et al., 1996). Bei der indirekten Aktivierung (cross-priming) stimulieren Tumorantigene gebunden an MHC-II auf APC antigenspezifische T-Zellen. Bei der direkten T-Zellaktivierung erfolgt die Stimulation hingegen über MHC-I-gebundene Peptide auf Tumorzellen. Obwohl Malignomzellen MHC-I-gebundene Peptide präsentieren können (Hunt et al., 1992), sind sie in der Regel nicht in der Lage eine effektive T-

Zellantwort zu induzieren (Yee et al., 2001). Die Transduktion von Tumorzellen mit kostimulatorischen Liganden oder Zytokinen kann hingegen *in vitro* und *in vivo* eine tumorspezifische T-Zellreaktion initiieren, die in Tiermodellen auch bei Reexposition mit nicht transduzierten Malignomzellen zu einer Abstoßung führt. Die Auswahl des Transgens ist hierbei von besonderer Bedeutung (Blankenstein et al., 1996; Cayeux et al., 1995; Cayeux et al., 1996; Huang et al., 1996; Vereecque et al., 2000). Durch gleichzeitige Expression von CD80 und IL-7, konnte beispielsweise die Immunogenität von Tumorzellen wesentlich verstärkt werden (Cayeux et al., 1995).

Will man die immunmodulatorischen Fähigkeiten von Tumorzellen durch Expression von Transgenen verbessern, kann man entweder Tumorzellen *in vitro*, zum Beispiel durch Elektroporation mit den gewünschten Zielgenen transduzieren oder die Transgene direkt *in vivo*, insbesondere durch virale Vektoren, in den Tumorzellen zur Expression bringen. Aufgrund der hohen Effizienz bei der Transfektion, der Fähigkeit auch ruhende Zellen zu transduzieren, dem Fehlen krebserregender Eigenschaften und der geringen Pathogenität, wurden replikationsdefiziente, adenovirale Vektoren in einer Reihe klinischer Studien und bei vielen tierexperimentellen *in vivo* Modellen eingesetzt (Graham, 2000).

2.2.8 Eigene Ergebnisse

2.2.8.1 Adenovirale Transduktion von Tumorzellen induziert Apoptose bei kokultivierten T-Zellen

Während replikationsdefiziente virale Vektoren eine Reihe molekularer Veränderungen in infizierten Zellen induzieren, ist wenig über ihren Einfluss auf nicht-transduzierte Zellen in ihrer unmittelbaren Umgebung bekannt (Borgland et al., 2000; Brand et al., 1999; Morelli et al., 2000). Im Rahmen unserer Studie (Scholz et al., 2002) wollten wir den Einfuss der adenoviralen Transduktion von Tumorzellen auf kokultivierte T-Zellen untersuchen. Hierzu wurden letal bestrahlte Osteosarkomzellen (SAOS-2) mit steigenden Mengen eines lacZ-exprimierenden Adenovirus (Ad-lacZ) transduziert. Anschließend wurden die unterschiedlich infizierten SAOS-2-Zellen mit PBMC kokultiviert. Zur Kontrolle wurden PBMC mit nicht-infizierten SAOS-2-Zellen koinkubiert. SAOS-2-Zellen adhärieren in Kultur. Nach sechstägiger Inkubation wurden die nicht-adhärenten Zellen geerntet. Diese Zellfraktion enthielt jeweils mehr als 90% $CD3^+$-Zellen, unabhängig davon, ob die PBMC zuvor mit nicht-infizierten (SAOS-2) oder transduzierten Tumorzellen (SAOS-2-Ad-lacZ) kultiviert worden

waren. Die Adenovirusinfektion der Tumorzellen hatte des weiteren keinen Einfluss auf die Effektorfunktionen der T-Zellen, dass heißt die T-Zellen waren etwa gleichermaßen in der Lage ^{51}Cr-markierte, nicht-infizierte SAOS-2-Zellen zu lysieren. Interessanterweise beobachteten wir jedoch, dass signifikant mehr T-Zellen achtzehn Stunden nach Restimulation apoptotisch waren, wenn sie primär mit adenoviralinfizierten Tumorzellen kokultiviert worden waren. So starben 40% der T-Zellen bei der Restimulation nach initialer Stimulation mit adenoviralinfizierten Tumorzellen, während dies nach primärer Kokultivierung mit nicht-infizierten Tumorzellen nur für 26% der T-Zellen galt. Das Ausmaß der T-Zellapoptose korrelierte positiv mit der Menge adenoviraler Vektoren, die zur initialen Transduktion eingesetzt worden waren. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Kokultur der PBMC mit den adenoviraltransduzierten Tumorzellen nicht zu einer adenoviralen Infektion der angereicherten $CD3^+$-Zellen führte. Es ist somit von einem indirekten Effekt auf die T-Zellen auszugehen.

Eine Messung der T-Zellapoptose am Tag sechs nach der primären Stimulation, d.h. vor der sekundären Stimulation, ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen T-Zellen, die initial mit nicht-infizierten versus T-Zellen, die initial mit adenoviralinfizierten Tumorzellen kokultiviert worden waren. Die Messung des löslichen CD95L/FasL bei Restimulation ergab keine Differenz zwischen den verschieden behandelten T-Zellen. Ebenso fand sich keine Ungleichheit bezüglich der CD95/Fas-Expression, der Apoptoseempfindlichkeit nach CD95/Fas-Ligation oder der TNF-α-Sekretion. Der Überstand adenoviralinfizierter Tumorzellen konnte nicht signifikant mehr AICD bei sekundärer T-Zellstimulation induzieren als der Überstand nicht-infizierter SAOS-2 Tumorzellen. Interessanterweise konnte jedoch die adenoviralvermittelte Expression von CD80 und IL-7 (Ad-IL-7/CD80) während der primären Stimulation den gesteigerten AICD bei Restimulation teilweise hemmen. T-Zellen, die primär mit Ad-IL-7/CD80-infizierten SAOS-2-Zellen stimuliert worden waren, zeigten darüber hinaus bei Restimulation eine stärkere Zytotoxizität gegen nicht-infizierte SAOS-2-Zellen als T-Zellen, die primär mit nicht-infizierten oder Ad-lacZ-infizierten Tumorzellen stimuliert worden waren.

Die beobachtete proapoptotische Wirkung adenoviral infizierter Tumorzellen auf kokultivierte T-Zellen könnte neben der begrenzten Transduktionseffizienz der Adenoviren bei *in vivo* Einsatz und der ungenügenden T-Zellinfiltration in adenoviral transduzierte Tumore, eine weitere Ursache für den geringen Erfolg adenoviraler Vakzinierungsansätze darstellen (Gilly et al., 1999; Kuball et al., 2002; Stewart et al., 1999; Willimsky und

Blankenstein, 2000). Das Phänomen gesteigerter T-Zellapoptose bei Kokultur mit viralinfizierten Zellen hat man auch für die Viren HIV-1 und HTLV-1 beobachtet. Hier konnten das HIV-*tat*-Protein bzw. das HTLV-1-*tax*-Protein für die gesteigerte T-Zell-Apoptose verantwortlich gemacht werden (Chlichlia et al., 1995; Li et al., 1995).

2.2.8.2 Nekrose, aber nicht Bestrahlung, zerstört die Kapazität CD80-exprimierender Tumorzellen zur T-Zellkostimulation

Anders als bei der adenoviralen Transduktion von Tumorzellen mit immunmodulatorischen Molekülen *in vivo*, werden bei der Tumorzellvakzinierung autologe Tumorzellen *in vitro* mit immunstimulierenden Molekülen transduziert und anschließend in den Organismus zurück gegeben. Um zu vermeiden, dass durch eine Tumorzellvakzine neue Tumorlast in den Körper gebracht wird, wird die Vakzine in klinischen Studien in der Regel durch Bestrahlung oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen abgetötet. Das gilt insbesondere wenn es sich hierbei um eine adjuvante Situation handelt, bei der klinisch, histopathologisch und bildgebend kein Hinweis auf weitere Tumormanifestationen vorliegt.
Es gibt Hinweise aus murinen Tumormodellen, die nahe legen, dass Tumorzellen durch Bestrahlung ihre Immunogenität verlieren (Cayeux et al., 1995; Cayeux et al., 1996; Hock et al., 1993), während andere Arbeiten einen derartigen Verlust verneinen (Dranoff et al., 1993). Ziel unserer Arbeit (Stärck et al., 2005a) war es daher, lebende Tumorzellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur direkten T-Zellstimulation *in vitro* zu analysieren und mit Tumorzellen zu vergleichen, die entweder durch Bestrahlung oder durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen abgetötet worden waren. Wir zeigten in diesem Zusammenhang, dass es durch Bestrahlung mit 80 oder 200 Gy nicht zu einer verminderten Expression des Transgens CD80 auf transduzierten Rhabdomyosarkomzellen (TE671/CD80) im Vergleich zu nicht bestrahlten TE671/CD80 kommt. Ebenso demonstrierten wir, dass zytotoxische T-Lymphozyten in gleichem Umfang bestrahlte und unbestrahlte TE671/CD80 Zellen lysieren. Des weiteren konnten bestrahlte und unbestrahlte TE671/CD80 Tumorzellen in gleichem Umfang T-Zellen reaktivieren und den AICD von T-Lymphozyten hemmen.
Im Gegensatz hierzu waren transgenexprimierende Tumorzellen, die durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren abgetötet worden waren, nicht in der Lage T-Zellproliferation zu induzieren, obwohl sie ähnliche Mengen des Transgens CD80 exprimierten. Während TE671/CD80-Zellen unmittelbar nach Bestrahlung nur zu einem geringen Prozentsatz

apoptotisch oder nekrotisch waren, waren Tumorzellen, die wiederholt eingefroren und aufgetaut worden waren, überwiegend nekrotisch. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass auch Bestrahlung nekrotischen Zelltod induziert kann (Kotera et al., 2001).

Um das Ausmaß an Nekrose bei bestrahlten Tumorzellen in unserem System weiter zu untersuchen, wurden TE671 Zellen mit 20 oder 80 Gy bestrahlt und nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden auf Zeichen der Apoptose oder Nekrose untersucht. Während Bestrahlung bei TE671 Zellen maximal 32% Nekrose induzierte (80 Gy nach 120 Stunden), verursachte ionisierende Strahlung bei anderen Tumorzell-Linien wesentlich höhere Prozentsätze an Nekrose. Beispielsweise induzierten sowohl 20 als auch 80 Gy bei der human B-lymphoiden Zell-Linie SKW-3 bereits nach 48 Stunden mehr als 80% Nekrose. Die zelltypabhängige Empfindlichkeit für bestrahlungsinduzierte Nekrose erklärt möglicherweise den im Tiermodell beobachteten Verlust an Immunogenität nach Bestrahlung. So reagierten die Zell-Linien (TS/A, J558L), die in den Arbeiten von Cayeux et al. eingesetzt wurden, in unserem Modell auf Bestrahlung mit hohen Nekroseraten (Cayeux et al., 1995; Cayeux et al., 1996).

Unsere Arbeit legt die Vermutung nahe, dass Tumorzellen, die durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen inaktiviert wurden, aufgrund der sofortigen vollständigen Nekrose dieser Zellen, weniger immunogen sind als Tumorzellen, die durch ionisierende Bestrahlung inaktiviert wurden. Grund hierfür ist zumindest *in vitro* die fehlende Fähigkeit zur direkten T-Zellaktivierung. Beim Vergleich von lebenden mit letal bestrahlten Tumorzellen konnte ein derartiger Unterschied *in vitro* nicht beobachtet werden. Ursache für den Verlust der Fähigkeit zur direkten T-Zellaktivierung, könnte beispielsweise die Unfähigkeit nekrotischer Tumorzellen sein zelluläre Synapsen zu bilden. Derartige zelluläre Synapsen sind jedoch die Voraussetzung für eine effektive T-Zell-Aktivierung (Davis et al., 2003) (Abb. 6).

Die Ergebnisse legen nahe, dass bei der Inaktivierung von Tumorzellen zur Vakzinierung Verfahren gewählt werden sollten, die möglichst wenig Nekrose induzieren.

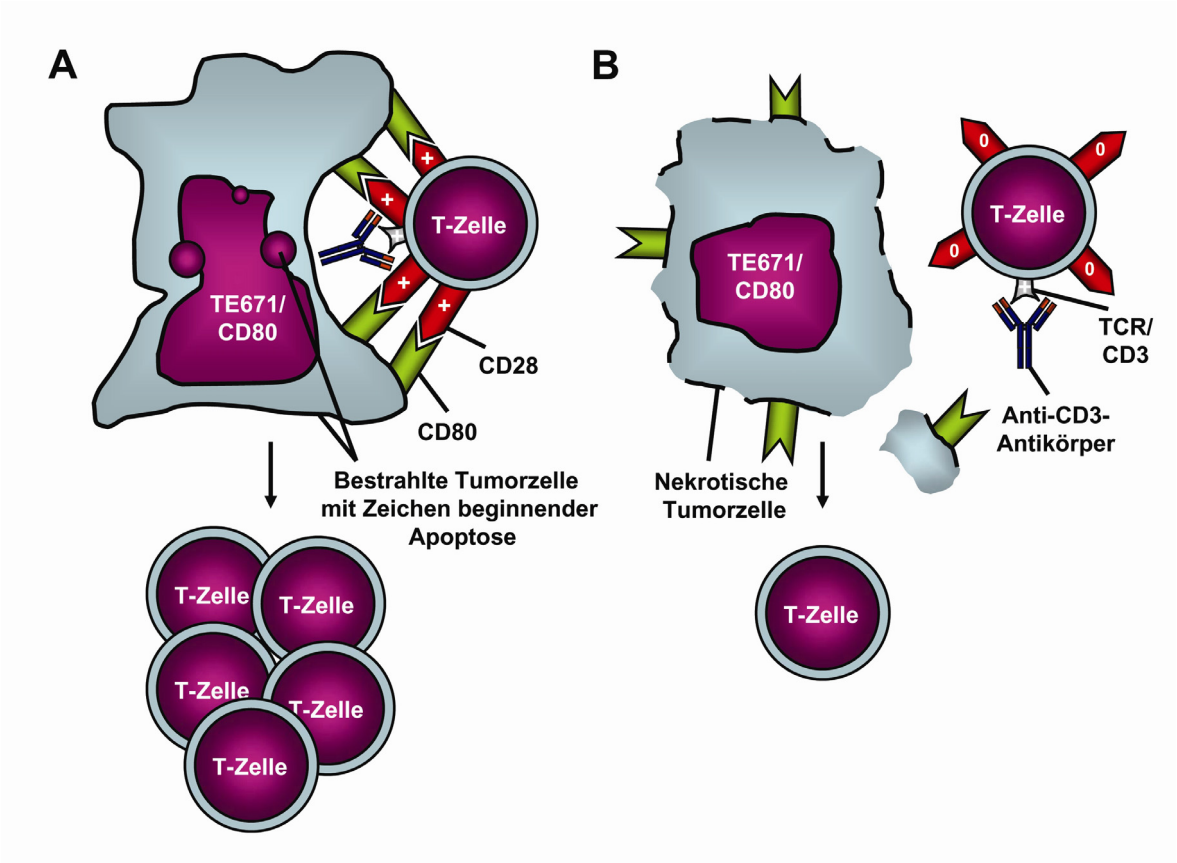

Abb. 6: Nekrotische Tumorzellen sind nicht zur direkten T-Zellaktivierung in der Lage.
(A) CD80-exprimierende, humane Tumorzellen (TE671/CD80) kostimulieren nach ionisierender Bestrahlung mit 80 Gy in gleichem Umfang wie nicht-bestrahlte TE671/CD80-Zellen anti-CD3-antikörpervermittelte T-Zellproliferation. Die bestrahlungsinduzierte Inaktivierung wird in der Abbildung durch Zeichen der beginnenden Apoptose (Kernfragmentierung, Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite, Blebbing) verdeutlicht. Bestrahlung induziert in Tumorzellen in erster Linie, aber nicht ausschließlich, Apoptose. (B) TE671/CD80, die durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen inaktiviert worden waren, waren unmittelbar nach Inaktivierung bereits vollständig nekrotisch. In der Abbildung wird die Nekrose durch das Zellfragment und die perforierte Zellmembran veranschaulicht. Die nekrotischen TE671/CD80-Zellen induzierten keine T-Zellproliferation.