

8. Zusammenfassung

Kostimulation ist essentiell für die Aktivierung der T-Zell-Effektorfunktionen und die Inhibition des aktivierungsinduzierten Zelltods (AICD). Während die Signalwege, die durch das kostimulatorische Molekül CD28 aktiviert werden, eingehend untersucht sind, ist wenig bekannt über die molekularen Ereignisse, die durch alternative Kostimulatoren induziert werden. 4-1BB/CD137, ein kostimulatorisches Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie, spielt eine wichtige Rolle bei der späten primären T-Zell-Stimulation und bei der Restimulation. Im ersten Teil meiner Dissertation zeige ich erstmalig, dass die Inhibition des AICD durch 4-1BB-Ligand mit Expression des anti-apoptotischen Proteins c-FLIP_γ einhergeht. Die Inhibition des AICD und die Hochregulierung von c-FLIP_γ und Bcl-x_L durch 4-1BB-Ligation wurden verhindert durch Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase oder AKT/Proteinkinase B, die auch bei der CD28-induzierten Inhibition des AICD beteiligt sind. Meine Ergebnisse verdeutlichen daher, daß diese Kostimulationsmoleküle, obwohl sie zu unterschiedlichen Superfamilien gehören, eine gemeinsame Signalendstrecke nutzen. Diese Ergebnisse tragen zum Verständnis der 4-1BB-vermittelten Signale bei, bringen sie in Relation zu den bereits gut untersuchten CD28-vermittelten Signalen und helfen so die molekularbiologischen Mechanismen der Kostimulation aufzuklären.

Der zweite Teil meiner Dissertation beschäftigt sich mit Tumorstimulation durch genetisch modifizierte Krebszellen, die kostimulatorische Signale induzieren. Solche Zellen wurden bereits erfolgreich in präklinischen Tiermodellen eingesetzt und werden gegenwärtig in verschiedenen klinischen Anwendungen evaluiert. Es wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass CD80 Tumorstimulation im syngenem Mausmodell erzeugen kann und dies die Deletion von aktivierten T-Zellen durch AICD verhindert. In klinischen Studien werden Tumorstimmulanzine generell inaktiviert um die Übertragung von lebenden Tumorzellen auszuschließen. Frühere tierexperimentelle Arbeiten suggerieren, dass die Inaktivierung von CD80-exprimierenden Tumorzellen durch ionisierende Strahlung den Stimulierungseffekt dieser Zellen aufhebt. Im Rahmen meiner Arbeit vergleiche ich lebende und bestrahlte allogene Tumorzellen bezüglich ihrer Fähigkeit, T-Zell-Effektorfunktionen hervorzurufen und T-Zell-AICD zu verhindern. Sowohl letal bestrahlte, als auch unbestrahlte CD80-exprimierende Tumorzellen induzieren in gleichem Umfang *in vitro* direkte T-Zell-Aktivierung mit T-Zell-Proliferation, Tumorzell-Lyse und Hemmung des AICD. Hingegen sind nekrotische, CD80-exprimierende Tumorzellen nicht in der Lage, T-Zellen direkt zu aktivieren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei der Inaktivierung von Tumorzellen Verfahren gewählt werden sollten, die möglichst wenig Nekrose induzieren.

Die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse tragen zum molekularbiologischen Verständnis der T-Zell-Kostimulation und zur Einsicht in die zellbiologischen Mechanismen der Tumorzellvakzinierung bei. Das Begreifen der bei der T-Zell-Aktivierung beteiligten Mechanismen birgt das Potential effektivere Immuntherapien zu entwickeln.

9. Summary

Costimulation is essential for the induction of T lymphocyte proliferation and inhibition of activation-induced cell death (AICD). While signalling pathways activated through the costimulatory molecule CD28 are well defined, less is known about the molecular events induced by alternative costimulators. 4-1BB/CD137, a costimulatory member of the tumour necrosis factor receptor family, plays an important role during late primary T cell stimulation and restimulation. In the first part of my thesis, I demonstrate for the first time that inhibition of activation-induced cell death by exposure to the 4-1BB ligand involves up-regulation of the anti-apoptotic protein c-FLIP_S. Inhibition of AICD by 4-1BB ligation and up-regulation of c-FLIP_S and Bcl-x_L were abolished by blocking the phosphatidylinositol 3 kinase or the AKT/protein kinase B, which also mediate CD28-induced inhibition of activation-induced cell death. My findings, therefore, demonstrate that costimulatory molecules, although belonging to different protein families and participating in distinct upstream signalling pathways, employ common downstream signalling pathways. These insights deepen our understanding of 4-1BB-mediated signalling, bring them in relation to the well-investigated CD28-mediated signalling and thus help to elucidate molecular biological mechanisms of costimulation.

The second part of my thesis focuses on tumour vaccination by the use of gene-modified cancer cells that provide costimulatory signals. Such cells have been successfully applied in preclinical animal models and are currently evaluated in a variety of clinical settings. In previous work, we demonstrated the efficacy of CD80 to promote tumour immunity in syngeneic murine models and to prevent deletion of activated T cells by AICD. In clinical trials, tumour cell vaccines are generally inactivated to avoid transfer of live tumour cells. Previous data indicated, however, that inactivation of tumour cells by lethal ionising irradiation abrogates tumour vaccination by CD80 expressing cells. Here, I compare living and irradiated allogeneic tumour cells regarding their capacity to induce T cell effector functions and their propensity to interfere with T cell AICD *in vitro*. Both, lethally irradiated and non-irradiated CD80 expressing tumour cells facilitated T cell proliferation, tumour cell lysis and interfered with AICD to a similar extent. In contrast, necrotic CD80 expressing tumour cells failed to costimulate T cell effector functions. These findings suggest that tumour cell vaccines should be inactivated by techniques that induce necrosis as little as possible.

Taken together, my results broaden our understanding of T cell costimulation and the cell biological mechanisms of tumour cell vaccination. A thorough understanding of the mechanisms involved in T cell activation can lead to the development of more effective immunotherapies.