Die Rolle von CD152 (CTLA-4) bei der Begrenzung von T-Zellantworten

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Dr. Monika Brunner-Weinzierl
geboren am 22.01.66 in Landshut

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

März 2003

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 13.11.2003

Gutachter: 1. Prof. Dr.med. B. Bröcker
2. Prof. Dr. med D. Kabelitz

Schlagwörter (deutsch): Immunologie, Kostimulation, CD152, Autoimmunität

Schlagwörter (englisch): Immunology, Costimulation, CD152, autoimmunity

für Stefan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung..... 4

Summary..... 6

I. Einleitung..... 7

1. Aktivierung von T-Zellen..... 7

2. Kostimulation von T-Zellen durch CD28..... 8

3. Abschaltung von Immunantworten.....10

3.1 Genetische Mechanismen zur Begrenzung von Immunantworten..... 11

3.2 Zelluläre Mechanismen zur Begrenzung von Immunantworten..... 12

II. Die Rolle von CD152 bei der Abschaltung von T-Zellantworten.....14

1. CD152 inhibiert frühe Mechanismen der primären T-Zellaktivierung....14

2. Die heterogene Expression von membranständigem CD152 auf aktivierten T-Zellen führt zu einer Diversifikation der klonalen T-Zellproliferation..... 16

3. Resistenz gegen Zelltod in T Helfer (Th)1 und Th2 Effektorzellen wird durch CD152 vermittelt.....19

4. Ausblick: Experimentelle Inaktivierung von CD152 zu beliebigen Zeitpunkten chronischer Entzündungen..... 22

III. Diskussion..... 24

Literatur.....29

Danksagung

Zusammenfassung

Bei der adaptiven Immunantwort wird ein breites Repertoire an Effektor-T-Zellen gebildet, das sich durch spezifische und vielfältige funktionelle Fähigkeiten auszeichnet. Neben der Aktivierung der Immunantwort werden Mechanismen benötigt, die Immunantworten regulieren und abschalten können, um unerwünschte Immunreaktion zu verhindern.

Die Arbeit befasst sich mit der Rolle von CD152 (CTLA-4), einem Homolog zu CD28, bei der Begrenzung von T-Zellantworten. Die Inhibition der Proliferationsbegrenzung der T-Zellen durch CD152 war ursprünglich auf eine späte Abschaltung der T-Zellproliferation zurückgeführt worden. Wir konnten zeigen, dass CD152 bereits die T-Zellaktivierung abschalten kann und somit die Aktivierungsschwelle der T-Zelle heraufsetzt. Wir konnten auch zeigen, dass CD152 die frühe T-Zellproliferation auf zwei Ebenen inhibiert: Durch die Transkriptionsinitiierung des autologen, Proliferation-induzierenden Zytokins IL-2 und durch die Expression von G1-Kinasen, die für das voranschreiten des Zellzyklus unerläßlich sind.

Bisher war es nicht möglich, individuelle, CD152-oberflächen-exprimierende T-Zellen zu detektieren. Um die Expression von CD152 auf der Oberfläche von T-Zellen zu analysieren, haben wir eine sensitive Färbemethode für Oberflächen-exprimiertes CD152 etabliert. Wir konnten damit zeigen, dass während einer antigen-spezifischen Stimulation Zellmembran-gebundenes CD152 lediglich auf einer Subpopulation von aktivierten Zellen ($CD152^+$ T-Zellen) exprimiert wird. Isolierte, aktivierte $CD152^+$ T-Zellen waren im Gegensatz zu aktivierten $CD152^-$ T-Zellen bei Restimulation in ihrer Proliferation inhibiert. Dies zeigt auch, dass CD152 in der Lage ist, bereits aktivierte T-Zellen zu inhibieren. Die heterogene Expression von CD152 auf der Oberfläche lässt vermuten, dass die CD152 exprimierenden Zellen, wenn sie ein CD152-Signal bekommen, eine andere Zelldifferenzierung einschlagen als Zellen ohne CD152.

Wiederholte oder chronische Aktivierung von Th-Zellen führt zu einer Form von Apoptose, dem Aktivierungs-induzierter Zelltod, gegen den Th2-Zellen resistent sind. Aktivierte Th2-Zellen exprimieren, im Gegensatz zu Th1-Zellen, häufiger CD152 auf ihrer Oberfläche. Wir konnten zeigen, dass CD152-Kreuzvernetzung von aktivierten T-Zellen direkt Resistenz gegen Apoptose vermittelt. Dies geschieht, indem ein

Signaltransduktionsmolekül, die PI3´Kinase, aktiviert wird. Dies führt zur Inaktivierung von Apoptose-unterstützenden Molekülen (Phosphorylierung von FKHRL1 und Herunterregulation von FasL) und zur Induktion des Apoptose-verhindernden Moleküls Bcl-2. Vermeidung von Apoptose ist eine zentrale Voraussetzung zur Induktion von Gedächtniszellen. CD152 exprimierende Zellen wären somit gute Kandidaten, um zu Gedächtniszellen zu differenzieren.

Um die Rolle von CD152 bei der späten T-Zelldifferenzierung in vivo untersuchen zu können, wurde das CD152 Gen konditionell in der Maus mutagenisiert.

Summary

During adaptive immune responses a broad repertoire of effector T-cells is generated, characterized by diverse functional capabilities. Besides activation of the immune response other mechanisms are needed in order to regulate and terminate responses, thus preventing unwanted immune reactions.

Here I focus on the role of CD152 (CTLA-4), a homologue of CD28, in the limitation of T-cell responses. Inhibition of T-cell-proliferation by CD152 was originally attributed to a late regulation of the T-cell proliferation. We now show that CD152 is already able to prevent the activation of T-cells and to set the threshold for their activation. We also show that CD152 inhibits T-cell activation in two ways: It inhibits the induction of the growth-factor IL-2 and it inhibits the expression of G1-kinases mandatory for the progression of the cell cycle.

Until now, it has not been possible to detect individual T-cells expressing CD152 at their surface. To analyze the expression of CD152 at the surface of individual cells, we developed a sensitive staining method. Using this technique we could show that antigen-specific stimulation of T-cells leads to the expression of surface-bound CD152 only on a fraction of the activated T-cells. Isolated, activated $CD152^+$ T-cells were inhibited in their proliferation whereas $CD152^-$ T cells were not. This also shows that CD152 is indeed able to inhibit already activated T-cells. The heterogenous expression of CD152 at the cell surface of already activated T-cells also suggests that CD152+ T-cells will differentiate differently compared to CD152-T-cells.

Repeated or chronic activation of Th-cells leads to one form of apoptosis, activation-induced cell death (AICD), against which Th2-cells are resistant. Activated Th2-cells express surface CD152 at higher frequencies than Th1-cells. We show here, that CD152-crosslinking of activated T-cells directly induces resistance against AICD by a mechanism requiring PI3´kinase. This leads to the inactivation of pro-apoptotic molecules (phosphorylation of FKHRL1 and downregulation of FasL). It also leads to the induction of the survival molecule Bcl-2. Prevention of apoptosis is a central prerequisite for the generation of memory cells. Therefore, surface $CD152^+$ T-cells might be good candidates to differentiate into memory cells.

To investigate the role of CD152 during the differentiation of T-cells in vivo, the CD152 gene was conditional mutagenese of the CD152 gene was generated.

I. Einleitung

1. Aktivierung von T-Zellen

Die Fähigkeit Antigene spezifisch zu erkennen ist fundamental für das adaptive Immunsytstem. Dies erlaubt dem Organismus nicht nur gegen potentielle fremde Pathogene zu reagieren, sondern auch fremde von körpereigenen Komponenten zu unterscheiden. Im Gegensatz zum Antigenrezeptor von B Zellen, die freies Antigen binden können, erkennen T-Zellrezeptoren (TZR) ein Antigen-prozessiertes Peptid nur im Komplex mit einem körpereigenen Molekül, dem „Major Histo-compatibiliy Complex“ (MHC). Der TZR weist somit eine duale Spezifität für das Antigen und für das MHC-Molekül auf. Dies wird als MHC-restringierte Spezifität bezeichnet. Peptid/MHC Klasse I Komplexe werden von CD8, Peptid-MHC Klasse II Komplexe werden von CD4 T-Zellen erkannt. Durch diesen Kontakt und weitere kostimulatorische Zell-Zell-Interaktionen sowie löslichen Faktoren, den Zytokinen werden die T-Zellen aktiviert; es entstehen reife T-Zellen, die ihre Effektorfunktion ausführen.

Die adaptive Immunantwort wird wesentlich durch $CD4^+$ T-Zellen, den sogenannten T Helfer Zellen, mitbestimmt. Diese lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen: T Helfer Zellen vom Typ1 (Th1) und vom Typ2 (Th2). Bestimmt wird die Differenzierung zu Typ1 oder Typ2 Zellen vor allem durch das Zytokinmilieu in dem die naiven T-Zellen aktiviert werden. In Anwesenheit von IL-12 entwickelt sich eine Th1-Antwort, in Anwesenheit von IL-4 wird eine Th2 Antwort initiiert. Für die zelluläre Immunantwort sind vor allem Th1-Zellen verantwortlich, die bewirken, dass Pathogene eliminiert werden. Th1-Zellen produzieren die Effektorzytokine IL-2 und IFNγ. Eine Fehlregulation von Th1-Immunanworten ist für verschieden Autoimmunerkrankungen beschrieben worden, so für systemischen Lupus Erythematodes (SLE), Multiple Sklerose (MS) und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie Rheumatoide Arthritis. Eine Th2 Antwort steuert die humorale Immunität. Die produzierten Effektorzytokine der T-Zelle sind hierbei IL-2, IL-5 und IL-10. Diese Zytokine aktivieren Mastzellen, Basophile, Eosinophile und B Zellen. Eine Fehlregulation von Th2 Antworten führt ebenfalls zur Immunpathologie, z.b. bei Reaktiver Arthritis oder Allergien.

2. Kostimulation von T-Zellen durch CD28

Während einer adaptiven Immunantwort wird ein breites Repertoire an spezifischen Effektor-T-Zellen generiert, die verschiedene funktionelle Möglichkeiten haben. Entscheidend für die Generierung einer funktionellen Vielfalt von T-Zellen

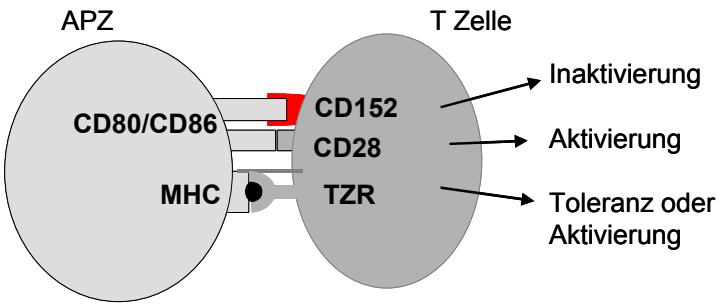

Abb.I.2.1: Stimulation der T-Zelle. Die T-Zelle benötigt ein Signal über den TZR und ein kostimulatorisches Signal durch CD28, das über MHC-präsentiertes Antigen und CD80 und CD86 auf der Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) bereitgestellt wird. Eine Inhibition der T-Zellstimulation kann über CD152 erfolgen, das ebenfalls die Liganden CD80 und CD86 auf der APZ bindet.

sind positive und inhibitorische kostimulatorische Signale, die die T-Zelle während einer Antigen-spezifischen Stimulation durch die Antigen-präsentierende Zelle (APZ) erhält. Dadurch wird sichergestellt, dass die Aktivierung und die Expansion der T-Zellen nur durch professionelle APZs erfolgen kann. Die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle sind CD28 and CD152, zwei Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, die Rezeptoren für solche Kostimulation darstellen (Abb.I.2.1).

Die Aktivierung der T-Zelle wird durch ein Antigen-spezifisches Signal am T-Zellrezeptor und ein Antigen-unspezifisches Signal durch ein kostimulatorisches Molekül initiiert. Das primäre kostimulatorische Molekül auf T-Zellen ist CD28 (Abb.I.1.2 und Abb.I.2.2). Die Stimulation von CD28 durch einen seiner Liganden CD80 oder CD86 auf APZs verstärkt die Aktivierung der Zelle durch Antigen,

induziert die Expression von IL-2 und Proliferation und verhindert Apoptose, vermutlich durch die Induktion von Bcl_{xL}, einem „Überlebens-Faktor“ (Linsley und Ledbetter, 1993; Mueller et al., 1989; Schwartz, 1992; Boise et al., 1995; Daniel et al., 1997).

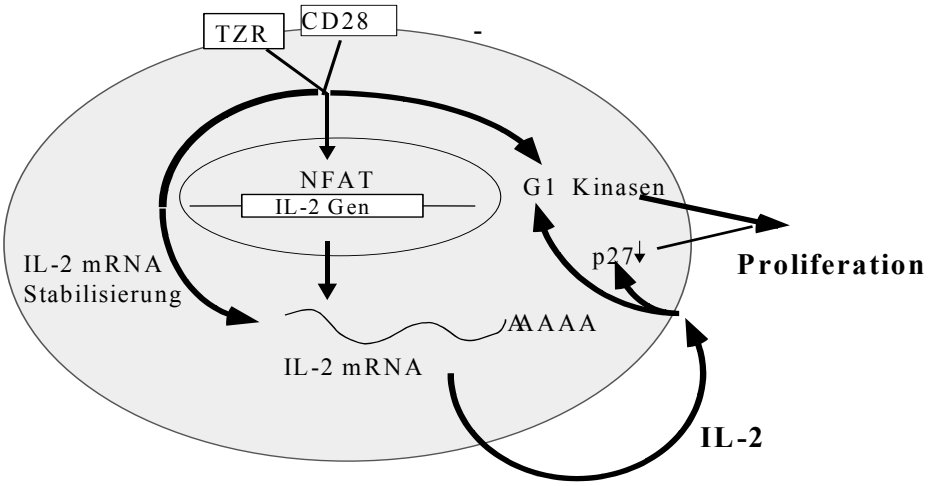

Abb.I.2.2: Das primäre kostimulatorische Molekül auf T-Zellen ist CD28. Erfährt eine T-Zelle ein Signal über den T-Zellrezeptor und CD28, wird ihre Proliferation eingeleitet, indem die IL-2 Transkription initiiert, die IL-2 mRNA stabilisiert und die G1-Kinasen exprimiert werden. G1-Kinasen sind essentiell für die Progression des Zellzyklus.

Neben CD28 gibt es auch andere Kostimulatoren zur Aktivierung von T-Zellen (Brunner, 1999), wie ICOS (Hutloff et al., 1999), CD30 (Vinay et al., 1998), CD27 (Lens et al., 1998), SLAM (Aversa et al., 1997), Ox40 (Weinberg et al., 1998; Higgins et al., 1999) und 4-1BB (Hurtado et al., 1997). Diese alternativen Kostimulatoren scheinen hauptsächlich in bestimmten Subpopulationen von T-Zellen relevant zu sein, in voraktivierten Zellen, Th1- oder Th2-Zellen oder in CD28-negativen T-Zellen (Watts et al., 1999). So sind ICOS, Ox40 und CD30 als Kostimulatoren für hochaktivierte T-Lymphozyten insbesondere des Typs2 beschrieben (Hutloff et al., 1999; Flynn et al., 1998; Annunziato et al., 1998; Del Prete et al., 1995), während SLAM Typ2 Polarisation inhibiert und als Kostimulator für T-Lymphozyten des Typs1 wirkt, wie 4-1BB (Aversa et al., 1997; Kim et al., 1998). 4-1BB scheint zudem die kostimulatorische Rolle von CD28 in chronisch aktivierten T-Zellen zu übernehmen

(nicht publizierte Daten, erwähnt in Watts et al., 1999). CD27 beschleunigt allgemein Differenzierungsprozesse und die Expansion von T-Zellen (Lens et al., 1998). Die dargestellten kostimulatorischen Moleküle unterscheiden sich dadurch, dass sie zusammen mit ihre Liganden während bestimmter Differenzierungsstadien der Zellen dynamisch exprimiert werden. Die Vielfalt der kostimulatorischen Moleküle und ihre differentielle Expression ermöglichen eine sehr genaue Kontrolle über Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktionen der T-Zellen.

3. Abschaltung von Immunantworten

3.1 Genetische Mechanismen zur Begrenzung von Immunantworten

Bisher wurden einige Polymorphismen u.a. der Gene von Zytokinen gefunden, die zu einer genetischen Disposition für bestimmte Pathologien wie Allergien oder Autoimmunerkrankungen führen (Daser et al., 1996). Auf der anderen Seite wurden auch Genpolymorphismen identifiziert, z.b. eine Mutation im Gen für CCR5, die vor bestimmten Immunpathologien, wie einer HIV-Infektion schützen (Samson et al., 1996).

Bei Autoimmunerkrankungen wurden vor allem auch HLA-Allele, z.b. HLA-DR4 bei Rheumatoider Arthritis, für eine genetische Disposition ermittelt. HLA-Allele werden als protektiv bezeichnet, wenn sie vermindert in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe auftreten (zusammengefasst in Bayrak et al., 1995). Protektive Allele wurden bei Diabetes mellitus (IDDM) beschrieben, wo verschiedene HLA-DQ Allele zusammen mit HLA-DR2 eine negative Assoziation bewirken. Bei Rheumatoider Arthritis (RA) wurde eine negative Assoziation für HLA-DR2, HLA-DR5 und HLA-DR7 gefunden. In der Maus wurden bisher zwar verschiedene Kandidaten für protektive Allele ermittelt, doch weder ihr Mechanismus der Schutzfunktion war bekannt, noch war ihre Funktion in einem Krankheitsmodell gezeigt worden.
Das protektive Allel $H2A^b$ hat einen dominanten, protektiven Effekt auf die Antikörperantwort, wenn eine Immunantwort gegen allo-4-Hydroxyphenylpurovat Dioxigenase (HPPD) ausgelöst wird. $H2A^k$ Allele fördern die Antikörperantwort. Wir

konnten durch Affinitätstudien zeigen, dass eine stärkere Bindung des antigenen Bereiches des Proteins an $H2A^b$ ausgeschlossen ist (Brunner et al., 1996). Durch quantitative Polymerasenkettenreaktion konnten wir zeigen, dass während der Immunantwort in Anwesenheit des $H2A^k$-Allels im Lymphknoten verstärkt Th2 Zytokine, in Anwesenheit des $H2A^b$-Allels verstärkt Th1-typische Zytokine transkribiert werden. Besonders deutlich war der Unterschied bereits 11 Stunden nach der Immunisierung: Responstiere reagierten mit einer Ausschüttung von IL-4, die in geschützten Tieren verhindert war. Die Ergebnisse wurden durch eine Blockade von IL-4 bestätigt, die eine Antikörperantwort gegen allo-HPPD in $H2A^k$ Mäusen verhinderte.

Da auch Polymorphismen in nicht-MHC-Genen, wie z.b. IL-1, IL-2, TNFα, eine Rolle bei immunologischen Krankheiten spielen können (Daser et al., 1996), wurde in einer vergleichbaren Studie der genetische A/J-Hintergrund in die MHC-kongenen Mäuse des C57BL/10 Stammes gekreuzt. Dadurch sollte der Einfluss von nicht-MHC-Genen ermittelt werden (Brunner et al., 1996). Zwar führte selbst bei A/J Mäusen bereits ein Allel $H2A^b$ zu einer starken Reduktion von Responstieren, doch sowohl die Antikörperantwort als auch der frühe Anstieg der IL-4 mRNA im Lymphknoten wurde durch eingeführte A/J-Gene in $H2A^{k/b}$ Hybridmäusen verstärkt.

Die Schutzfunktion von $H2A^b$ wurde in einem Krankheitsmodell für Rheumatoide Arthritis, der Kollagen-Induzierten-Arthritis in der Maus, untersucht (Mitchison and Brunner, 1996). Der Krankheits-assoziierte Mäusestamm DBA/1 wurde mit verschiedenen Mäusen gekreuzt, um H-2 Haplotypen einzugrenzen, die einen Schutz gegen Kollagen-induzierte Arthritis vermitteln. Hierbei konnten wir feststellen, dass vor allem $H2A^b$ zu einer starken Reduktion des Krankheitsausbruchs, als auch zu einer Verminderung der Krankheitslänge beitrug. Zusammenfassend konnten wir für das protektive $H2A^b$ Allel zeigen, dass es sich bei verschiedenen Immunantworten als „Schutzgen“ erwiesen hat. Es liegt nahe zu spekulieren, dass der Schutzmechanismus nicht allein durch die Epitopbindung zustande kommen kann, sondern Differenzierungsmechanismen wirken. Eine Möglichkeit wäre, dass die verschiedenen MHC-Allele in verschiedenen Dichten auf der Antigen-präsentierenden Zelle exprimiert werden. Die quantitativen Unterschiede könnten zu verschieden starken T-Zellstimulation führen und damit zu einer unterschiedlichen Differenzierung der T-Zellen (Brunner et al., 1996).

3.2 Zelluläre Mechanismen zur Begrenzung von Immunantworten

CD28 und CD152 (CTLA-4) sind Rezeptoren der Zellmembran und liegen nebeneinander auf Chromosom 1 (Chambers et al., 1996). Die Expression von CD152 wird durch CD3- und CD28-Signale induziert. CD152 konkurriert dann mit CD28 um Bindung an die Liganden CD80 und CD86, wobei es eine höhere Affinität als CD28 hat. CD152-Signale inhibieren, durch Phosphatasen vermittelt, die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors (Marengere et al., 1996; Lee et al., 1998). Außerdem führen CD152-Signale zur Induktion der Expression von TGF-β, einem Zytokin, das Immunreaktionen unterdrückt (Chen et al., 1998). CD152 spielt dadurch eine begrenzende Rolle bei der durch den Antigenrezeptor CD3 und den Kostimulator CD28 induzierten T-Zellaktivierung, Proliferation und Sekretion von IL-2 (Walunas et al., 1996; Krummel et al., 1996; Brunner et al., 1999).

Die fundamentale Bedeutung von CD152 für die Begrenzung von Immunreaktionen zeigt sich bei CD152-defizienten Mäusen, die bereits wenige Wochen nach der Geburt an einer lymphoproliferativen Störung sterben. Die CD152-defizienten T-Zellen dieser Mäuse haben den Phänotyp von aktivierten T-Lymphozyten, proliferieren spontan ex vivo (Waterhouse et al., 1995; Tivol et al., 1995; Chambers et al., 1996) und infiltrieren u.a. die Leber, sogar nach dem Transfer in einen neuen Wirt (Bachmann et al., 1999). Diese Lymphoproliferation ist abhängig von Antigen und CD28-Kostimulation, denn in monospezifischen, T-Zellrezeptor-transgenen Mäusen und in solchen, in denen CD80 und CD86 durch ein CD152-Immunglobulin-Fusionsprotein geblockt sind, findet die exzessive Lymphoproliferation nicht statt (Tivol et al., 1997). In Mausmodellen konnte auch gezeigt werden, dass CD152 an pathologischen Immunreaktionen beteiligt ist. Durch Administration von αCD152 Antikörper wird die Immunreaktion gegen Parasiten verstärkt (McCoy et al., 1997), ebenso wie die Tumorabstoßung (Leach et al., 1996). Bei dem Mausmodell für Multiple Sklerose Experimenteller Autoimmune Encephalomyelitis sowie bei Diabetes in NOD-Mäusen wird der Ausbruch der Krankheiten durch Administration von αCD152 Antikörpern verstärkt und beschleunigt (Hurwitz et al., 1997; Luhder et al., 1998).

Neben CD152 gibt es noch andere Wege der Deaktivierung von T-Lymphozyten. PD-1, das einzige weitere inhibitorische Molekül auf T-Zellen, ist allerdings auch auf B Zellen exprimiert. Ein PD-1-Signal während einer Stimulation der T-Zelle durch αCD3 and αCD28 inhibiert die T-Zellaktivierung, -proliferation und die Zytokinproduktion. Mäuse mit einer genetischen Deletion von PD-1 entwickeln Autoimmunerkrankungen, die durch hohe Antikörperkonzentrationen im Blut charakterisiert sind. Terminal ist die Induktion der Apoptose durch das Fas/Fas-Ligand System (Moulian et al., 1998). Defekte im Fas/FasL-System können zu chronischen Autoimmunkrankheiten führen (Hünig et al., 1997). Pleiotrop inaktivierend können Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und Transforming Growth Factor-β (TGF-β) wirken (Weiner et al., 1997; Letterio et al., 1998).

CD152 ist an zentralen Signaltransduktionswegen beteiligt, die Toleranzinduktion, Zellzyklus, Zelltod, Zytokinproduktion und Differenzierung von T-Zellen regulieren. Einige Daten deuten sogar darauf hin, dass durch Antigen und Kostimulation aktivierte T-Zellen durch CD152-Signale zu Gedächtniszellen werden könnten, weil sie durch CD152 im Zellzyklus arretiert und durch CD28 vor Apoptose geschützt werden (Krummel et al., 1996; Blair et al., 1998; Chen et al., 1998; Brunner et al., 1999). Im folgenden werden eigene Arbeiten zu den beschriebenen Aspekten im Zusammenhang mit CD152 untersucht, die die fundamentale Rolle von CD152 für die Regulation der adaptiven Immunantwort noch stärker betonen. Die Kenntnis der diese Vorgänge regulierenden Mechanismen ist für das Verständnis der Ätiopathogenese von Entzündungsprozessen und die Entwicklung von Therapiestrategien wesentlich.

II. Die Rolle von CD152 bei der Abschaltung von Immunantworten

1. CD152 inhibiert frühe Mechanismen der primären T-Zell-aktivierung

Die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten unterliegt einer strikten Kontrolle, um Toleranz gegen Selbstantigene, Reaktivität gegen Fremdantigene und Effektivität der Reaktion gegen Pathogene zu gewährleisten. Die Kontrolle wird im wesentlichen durch Antigen-präsentierende Zellen und andere Lymphozyten ausgeübt, durch MHC-Restriktion, Kostimulation und Zytokine. CD152 (CTLA-4) ist das bedeutendste bekannte negativ-kostimulatorische Molekül für T-Lymphozyten.

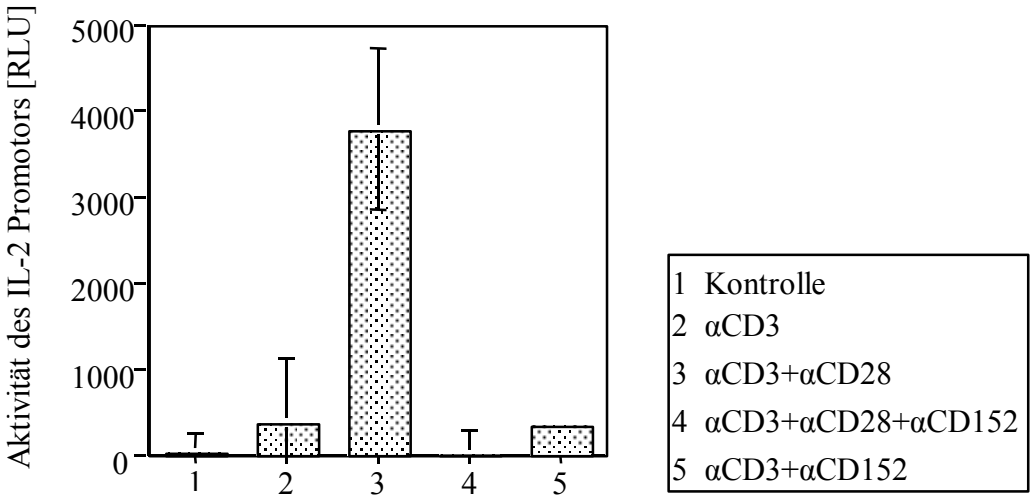

Abb. II.1.1: CD152-Kreuzvernetzung verhindert die IL-2 Transkription. Es wurden transgene Mäuse verwendet, die den IL-2 Promotor vor einem Luziferasegen tragen. Nach der T-Zellaktivierung von $CD4^+$ T-Zellen in vitro wurde die Luziferaseaktivität gemessen, die der Transkriptionsaktivität des IL-2 Promotors entspricht.

Den Mechanismus der durch CD152 vermittelten Inhibition der T-Zellaktivierung haben wir zunächst in vitro untersucht. Wir konnten zeigen, dass die Kreuzvernetzung von CD152 durch Antikörper die Akkumulation von IL-2 mRNA in den aktivierten T-Zellen verhindert. Dieser Effekt beruht nicht auf einer Destabilisierung der IL-2 mRNA sondern auf einer Inhibition der Initiierung der Transkription des IL-2 Gens (Abb. II.1.1). Der IL-2 Promoter hat 5 Bindungsstellen für

Transkriptionsfaktoren der "**N**uclear **F**actors of **A**ctivation of **T** cells" -Familie (NF-ATp, NF-ATc, NF-AT3 und NF-AT4). Alle Bindungsstellen müssen besetzt sein, damit IL-2 Transkription initiiert wird. Da wir zeigen konnten, dass CD152 Kreuzvernetzung die Translokation von NF-AT in den Zellkern verhindert, könnte die inhibierende Wirkung von CD152 auf die IL-2 Transkription zumindest teilweise durch diese Inhibition der NF-AT Translokation erklärt werden (Brunner et al., 1999).
Die Proliferationsbegrenzung der T-Zellen durch CD152 war ursprünglich allein auf die Inhibition der Expression des autologen, Proliferation-induzierenden Zytokins IL-2 zurückgeführt worden. Wir konnten jedoch zeigen, dass CD152 auch die Expression der Zellzyklusregulatoren Zyklin D3, cdk4 und cdk6 hemmt, wobei zumindest die Expression von CDK6 unabhängig von IL-2 ist. Die IL-2 unabhängige Inhibition der T-Zellproliferation durch CD152 konnten wir dadurch bestätigen, dass sie sich durch Zugabe von IL-2 nicht aufheben ließ. CD152 inhibiert also die aktivierungsinduzierte T-Zellproliferation auf zwei Ebenen: Durch IL-2 Transkriptionsinitiierung und durch die Expression von G1-Kinasen (Abb. II.1.2).

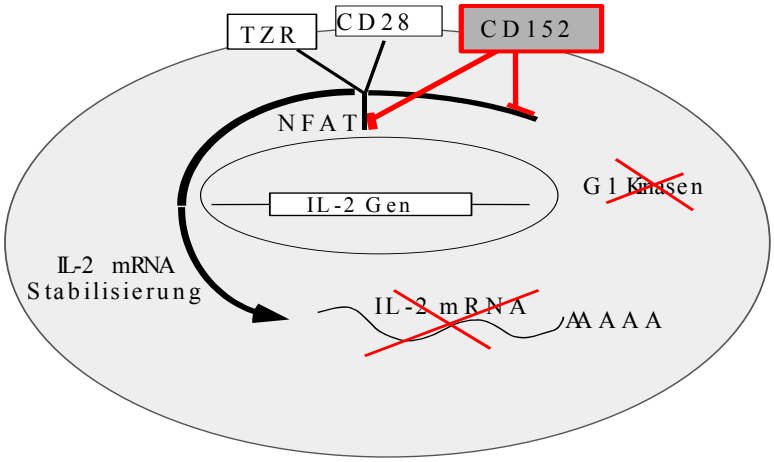

Abb. II.1.2: CD152 inhibiert die Proliferation der T-Zelle auf zwei Ebenen.
Bei einer Stimulation der T-Zelle mit αCD3, αCD28 und αCD152, inhibiert CD152 a) NF-AT Akkumulation im Nukleus und b) die Expression von G1-Kinasen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus notwendig sind. Die CD28-induzierte mRNA-Stabilisierung ist durch ein CD152-Signal nicht beeinflusst.

2. Die heterogene Expression von membranständigem CD152 auf aktivierten T-Zellen führt zu einer Diversifikation der klonalen T-Zellproliferation

Auf T-Lymphozyten ist membranständiges CD152 durch konventionelle Immunfluoreszenz selbst 48 Stunden nach Beginn der T-Zellaktivierung kaum nachweisbar (Krummel et al., 1996, siehe Abb. II.2.1 A). Wir wissen jedoch, dass CD152, obwohl es zu diesem Zeitpunkt kaum nachweisbar ist, die Proliferation der T-Zellen bereits inhibieren kann. Wir haben eine hochsensitive Färbemethode für den immunfluoreszenten Nachweis von Oberflächenproteinen entwickelt, den magnetofluoreszenten Liposomen (Scheffold et al., 1996). Diese Technologie erlaubt den Nachweis von weniger als 100 Molekülen einer Art pro Zelle (Scheffold et al., 1999) und bietet damit gegenüber konventioneller Immunfluoreszenz eine mehr als 100fach empfindlichere Nachweisgrenze. Liposomen-Färbungen von aktivierten T-Lymphozyten auf CD152 (Abb. II.2.1 B) zeigen, dass CD152 von diskreten Subpopulationen exprimiert wird. Wir sind erstmals in der Lage, individuelle CD152-exprimierende Zellen auch zytometrisch darzustellen und für funktionelle Untersuchungen zu isolieren.

Milzzellen wurden für 48 Stunden mit 1µg/ml ConcavalinA stimuliert (Abb. II.2.1). Es sind die $B220^-$ T-Zellen dargestellt, die sich hauptsächlich aus $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zusammensetzen. A) Diese T-Zellen wurden mit αCD152 Dig und einem αDig FITC gekoppelten Antikörper markiert und zytometrisch analysiert. Es waren 2% $CD152^+$ Zellen erfasst worden (weiße Kurve). Es ist nicht erkennbar, ob die gesamte Population angefärbt ist. B) Die T-Zellen wurden mit αCD152 Dig und αDIG besetzten mangnetofluoreszenten Liposomen gefärbt. Es ist eine $CD152^+$ Zellpopulation erkennbar, die 15% der T-Zellen ausmacht. C) Die Färbung in B) wurde durch unmarkierten αCD152 Antikörper im Überschuss geblockt.

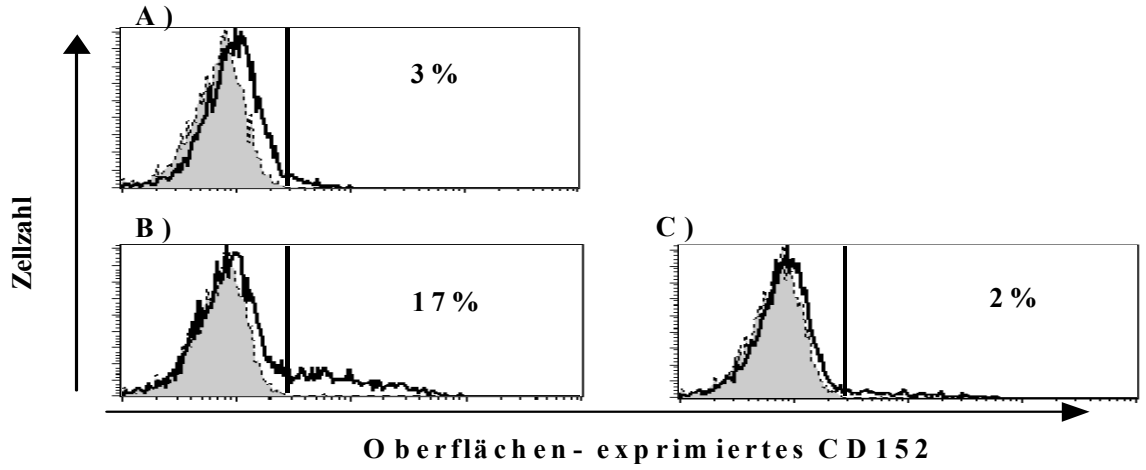

Abb. II.2.1: Zytometrische Darstellung von individuellen T-Zellen mit membrangebundenem CD152 (siehe Text).

Naive OVA-TZR^{tg} T-Zellen (CD62L^{+}, CD4^{+}) wurden mit magnetischer Zellsortierung (MACS) isoliert (Abb. II.2.2), für 48 h mit bestrahlten Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und OVA$_{323-339}$ aktiviert und mit unserer sensitiven Färbung für CD152 markiert (oben), isoliert und in getrennten Fraktionen mit APZ und Antigen restimuliert (unten). Zwei Tage nach Restimulation wurde die Proliferation der Fraktionen anhand der CFSE-Färbung detektiert. CD152^{+} T-Zellen (rechts unten) waren im Gegensatz zu CD152^{-} T-Zellen (links unten) refraktär gegenüber einer Antigen-spezifischen Restimulation.

Die unterschiedliche Expression von membranständigem CD152 auf aktivierten T-Zellen lässt vermuten, dass CD152^{+} und CD152^{-} T-Zellen verschiedene funktionelle Bestimmungen auszuführen haben. Dies könnte besonders wichtig für die adaptive Immunantwort sein, denn die Generierung von T-Zellen mit verschiedenen Effektorfunktionen ist eine grundlegende Eigenschaft der adaptiven Immunantwort. Isolierte, aktivierte CD152^{+} T-Zellen waren im Gegensatz zu aktivierten CD152^{-} T-Zellen bei Restimulation in ihrer Proliferation inhibiert. Diese heterogene Expression von CD152 auf aktivierten T-Zellen gewährleistet die Mannigfaltigkeit einer klonalen T-Zellantwort.

Unsere Daten zeigen auch, dass CD152 tatsächlich in der Lage ist, bereits aktivierte, individuelle T-Zellen zu inhibieren. CD152 könnte demnach sehr wohl auch etablierte, „laufende“ Immunantworten, wie sie bei chronischen Entzündungen vorliegen, regulieren.

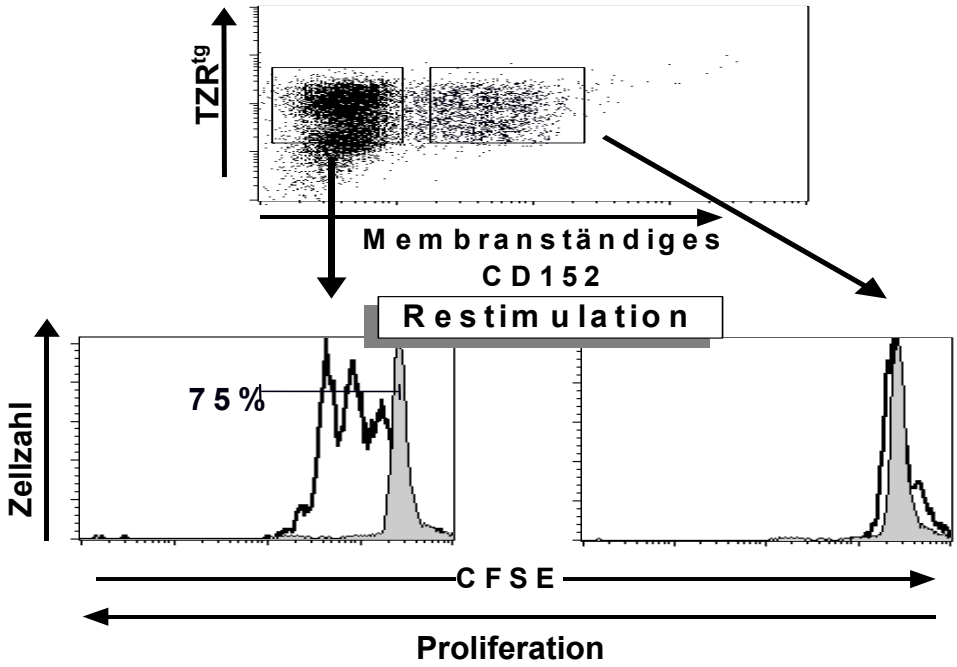

Abb. II.2.2:Aktivierte, individuelle CD152^{+} T-Zellen sind refraktär gegenüber einer Antigen-spezifischen Restimulation (siehe Text).

3. Resistenz gegen Zelltod in T Helfer (Th)1- und Th2-Effektorzellen wird durch CD152 vermittelt

Eine Kinetik der Expression von Zellmembran-gebundenem CD152 auf Th1- und Th2-Zellen zeigte, dass Th2-Zellen nach Restimulation wesentlich häufiger CD152 exprimieren als Th1-Zellen, vor allem nach Restimulation (Abb. II.3.1). Die differentielle CD152-Expression auf Th1- und Th2-Zellen lässt auf eine wichtige Rolle von CD152 bei Th2-Zellen schließen.

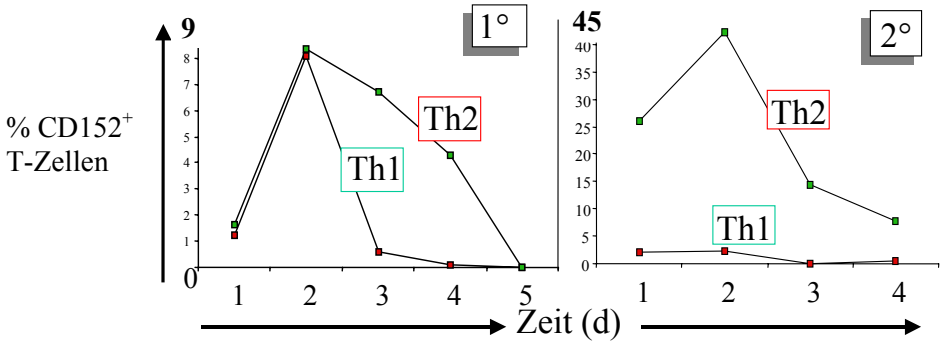

Abb. II.3.1: Th2-Zellen exprimieren nach Restimulation häufiger CD152 auf ihrer Oberfläche als Th1-Zellen. Die Zellen wurden unter Th1-, bzw. Th2-Bedingungen kultiviert und die CD152-exprimierenden T-Zellen mit Hilfe unserer sensitiven Färbemethode identifiziert. Die Häufigkeit CD152 exprimierender T-Zellen ist in einer primären (links) und sekundären (rechts) Stimulation über der Zeit angegeben.

Da ein wichtiger Unterschied in der Regulation der Th1-Th2 Hoemeostase der Aktivierungs-induzierte Zelltod ist, wurde die Rolle von CD152 beim Aktivierungs-induzierten Zelltod untersucht. Es ist bereits bekannt, dass Th1-Zellen empfänglich für Aktivierungs-induzierten Zelltod sind, wohingegen Th2-Zellen resistent sind. Wir konnten zeigen, dass eine CD152-Blockade zu verstärkter Apoptose in Th-Zellen führt. Die ermittelten Prozentzahlen der Zellen, die nun für Zelltod empfänglich sind, korrelieren mit den ermittelten Prozentzahlen der CD152-Oberflächen-exprimierenden T-Zellen.

Diese Daten konnten wir bestätigen, indem wir aktiv ein CD152-Signal in Th2-Zellen induziert haben (Abb. II.3.2.). Die Überlebensrate der Zellen wurde dadurch um 25% gegenüber Th2-Zellen ohne initiiertes CD152-Signal gesteigert. Wir konnten zeigen, dass der Effekt nicht indirekt war: 1. Eine veränderte IL-2 Produktion durch CD152-Kreuzvernetzung konnte als Grund für die Steigerung der Überlebensrate der Th2-Zelle ausgeschlossen werden. 2. Da ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase zu Resistenz gegen Apoptose führen kann und CD152 diesen G1-Arrest vermitteln kann, wurde auch dieser indirekte Effekt zur Resistenzinduktion von Th2-Zellen mit Hilfe der Zellzyklusinhibitoren db cAMP und Mimosin ausgeschlossen.

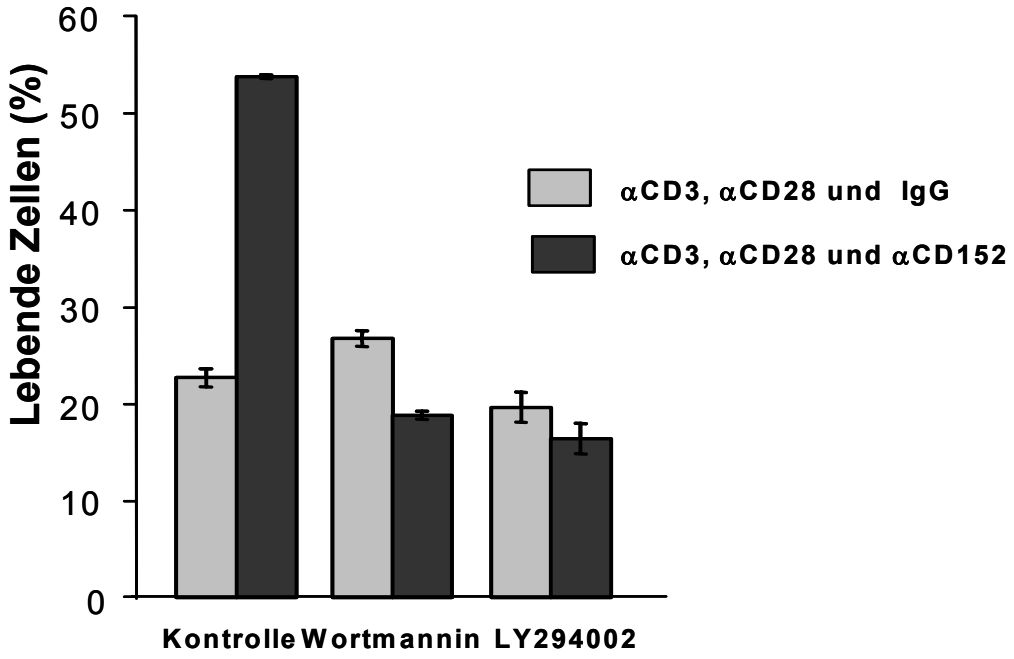

Abb. II.3.2: Kreuzvernetzung von CD152 während einer Stimulation von polarisierten Th2-Zellen mit CD3 und CD28 führt zu Resistenz gegen Zelltod (Apoptose). Am Tag 2 nach Restimulation von Th2-Zellen mit αCD3 und αCD28 wurden die T-Zellen unter CD152-Kreuzvernetzung oder wie angegeben stimuliert. Apoptotische Zellen wurden durch PI und Annexin-V Färbung identifiziert. Die Spezifität der Ca^{2+}-abhängigen Annexin-V Färbung wurde durch EGTA Zugabe kontrolliert. Lebende Zellen sind in Prozent angegeben. Die CD152-vermittelte Resistenz gegen Apoptose ist blockierbar durch die PI3´Kinase-Inhibitoren Wortmannin und Ly294002.

Eine Blockade der Fas/FasL-induzierten Apoptose in Th1- und Th2-Zellen verhinderte den gesamten, durch CD152-Blockade-induzierten Zelltod. Die Abhängigkeit vom Fas/FasL System der CD152-induzierten Resistenz der Th2-Zellen gegen Apoptose konnte durch eine reduzierte FasL-Expression erklärt werden (Abb. II.3.3).

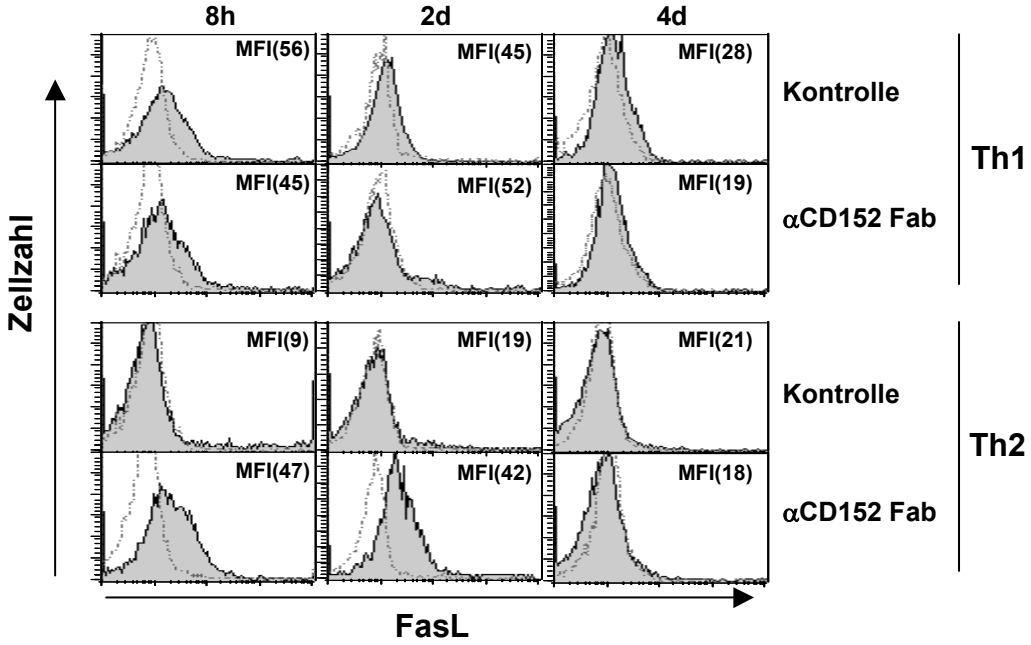

Abb. II.3.3: CD152-Blockade verstärkt die Expression von FasL in Th2-Zellen. Polarisierte Th2-Zellen wurden Antigen-spezifisch mit (untere Quadranten), bzw. ohne CD152 Blockade restimuliert (obere Quadranten). Anschließend wurde FasL auf Th-Zellen zytometrisch detektiert.

4. Ausblick: Experimentelle Inaktivierung von CD152 zu beliebigen Zeitpunkten chronischer Entzündungen

Durch genetische Inaktivierung könnte CD152 gezielt in Zellen ausgeschaltet werden, die definierte Stadien der T-Zellontogenese repräsentieren. Um CD152 zu beliebigen Zeitpunkten in beliebigen Zelltypen genetisch inaktivieren zu können, wollen wir eine konditionelle CD152-Mutation in der Maus herstellen. So sollte die Rolle von CD152 in wiederholten, polarisierten und/oder chronischen T-Zellreaktionen klar werden. Die genetische Inaktivierung hat gegenüber der serologischen Inaktivierung durch Antikörper oder lösliche Liganden wesentliche Vorteile. Zum einen wird CD152 als Membranbestandteil von sekretorischen Vesikeln in den Aktivierungskomplex auf der Grenzfläche zwischen Antigen-präsentierende Zelle und T-Zelle gebracht (Linsley et al., 1996; Alegre et al., 1996; Shiratori et al., 1997), so dass nicht klar ist, inwieweit αCD152 Antikörper überhaupt CD152 effizient blockieren können. Zum anderen ist nicht klar, ob die Bindung von Liganden an CD152 aktivierend, blockierend oder beides ist, abhängig von der jeweiligen Situation (Krummel et al., 1996; Walunas et al., 1996; Wu et al., 1997; Zheng et al., 1998; Horspool et al., 1998). Zum dritten ist es nicht möglich, in vivo nur bestimmte Zellen serologisch zu blockieren, während eine genetische Inaktivierung zelltypspezifisch sein kann und auf ein bestimmtes Differenzierungsstadium dieser Zelle begrenzt sein kann (Lakso et al., 1992; Rickert et al., 1997; Jacob und Baltimore, 1999).

Um CD152 konditionell genetisch ausschalten zu können, haben wir zunächst loxP Signale in das murine CD152 Gen eingeführt (II.4.1). Gleichzeitig benötigen wir Mäuse, die transgen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle induzierbarer oder Zelltyp-spezifischer Promotoren exprimieren können. Wir planen Mäuse zu verwenden wie die Tetrazyklin- und IFN-γ-abhängigen Cre-Mäuse und die GranzymB-Promotor Cre-Mäuse (Jacob und Baltimore, 1999). Aktivierte T-Zellen mit definierten Phänotypen würden wir magnetisch isolieren, ihre CD152-Expression zytometrisch analysieren und ihren Genotyp mit quantitativer, “real time" PCR bestimmen.

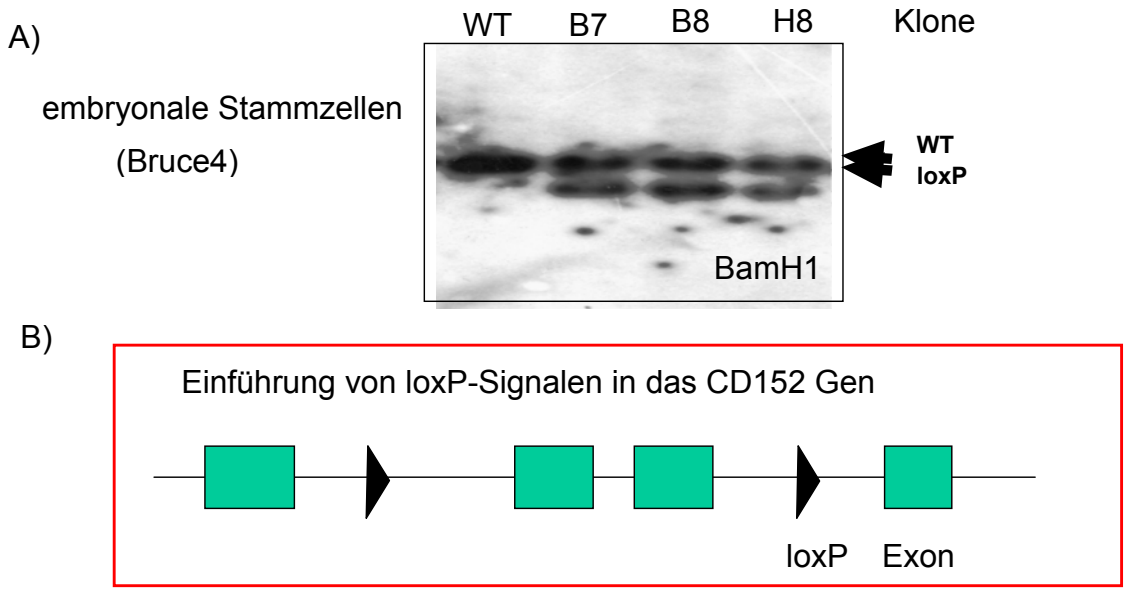

Abb.II.4.1: Eingeführte loxP- und BamH1-Signale in das CD152-Gen.
Die 3´-eingeführte loxP Sequenz in das CD152-Gen hat ein BamH1-Signal integriert. Dadurch entsteht bei einer Restriktionsanalyse (A) des mutagenisierten CD152 Gens mit BamH1 ein um 500bp verkürztes Fragment verglichen mit dem ursprünglichen Gen (WT), wenn man im folgenden Southernblot die Sonde im Exon 4 hybridisiert (B). So zeigen ES Zellen, bei denen durch homologe Rekombination loxP Signale in ein Allel von CD152 eingeführt wurden, bei einer Restriktionsanalyse mit BamH1 und folgender Southernblotanalyse mit Hybridisierungssonde im Exon 4 zwei Fragmente (B; Klone B7, B8 und H8) (Dreieck: loxP Signal; B: BamH1; grünes Viereck: Exon).

III. Diskussion

Das Wissen, wie das Immunsystem unerwünschte Immunreaktionen abschaltet und kontrolliert, könnte für therapeutische Ansätze ausgenutzt werden. Dieser Ansatz ist besonders interessant, da bei Ausnutzung der natürlichen Fähigkeiten des Immunsystems, spezifisch Immunreaktionen abzuschalten keine Nebenwirkungen der Therapie zu erwarten sind.

CD152 inhibiert die T-Zellaktivierung

CD152 ist ein Molekül auf T-Zellen, das T-Zellantworten abschalten kann (Brunner et al., 2000; Chambers et al., 1996). Wir konnten zeigen, dass CD152 zu verschiedenen Zeitpunkten einer T-Zellantwort auf verschiedene Weise inhibitorisch wirken kann (Abb. III.1). So kann bei suboptimaler Stimulation der T-Zelle bereits die Aktivierung der T-Zelle durch CD152 verhindert werden (Brunner et al., 1999). Dieser frühe Kontrollpunkt der T-Zellaktivierung ist wichtig, um eine Aktivierung von T-Zellen vorzubeugen, wenn der Stimulus, z.B. das Antigen nicht ausreichend vorhanden sind. Zum anderen ist eine Kontrolle der Aktivierungsschwelle der T-Zellen nötig, um Toleranz aufrechtzuerhalten (Allison et al., 1998). Kritisch ist die Erhöhung der Aktivierungsschwelle allerdings im Zusammenhang mit Tumorabstoßung zu betrachten. Hier unterbindet CD152 wahrscheinlich eine effektive Abstoßung des entarteten Gewebes. Dies wurde bereits bestätigt, da eine Blockade von CD152 zu einer Tumorabstoßung führen kann (Chambers et al., 1996).
Die frühen Effekte von CD152 während der T-Zellaktivierung erfolgen ohne dass membranständiges CD152, wohl aber RNA von CD152, detektierbar war (Brunner et al., 1999; Maszyna et al., zur Revision). Demnach muss bei T-Zellaktivierung entweder CD152-Protein in kleinen Mengen auf der Oberfläche der T-Zelle vorhanden sein, oder aber es wird schnell hochreguliert, wie es z.B. für IL-4 bereits gezeigt wurde (Brunner et al., 1995). Hierbei ist in Betracht zu ziehen, dass bereits sehr geringe Mengen von CD152 funktionell sein können, da es zum einen polarisiert in der immunologischen Synapse exprimiert wird und zum anderen eine wesentlich

höhere Affinität zu CD80 und CD86 hat, wodurch es CD28 von diesen Liganden verdrängen kann.

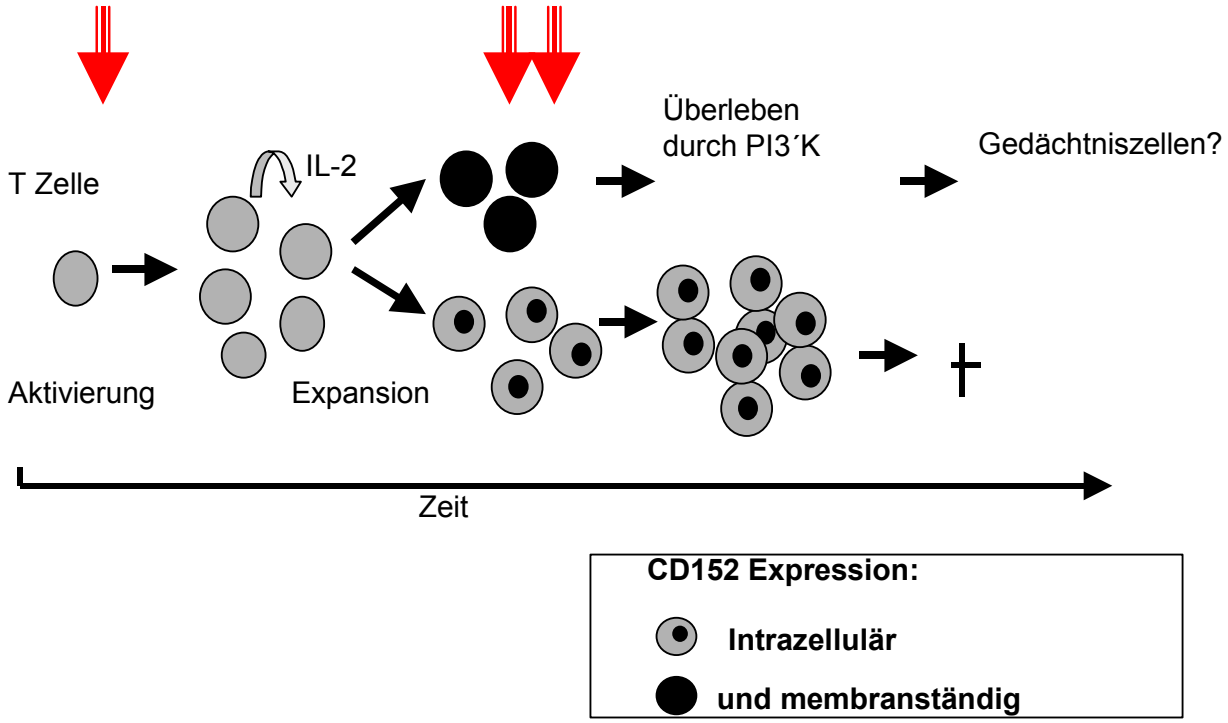

Abb. III.1: Zusammenfassung der verschiedenen Funktionen von CD152 bei der Immunantwort. CD152 kann unter suboptimaler T-Zellstimulation die T-Zellaktivierung verhindern (roter Pfeil). Bei einer optimalen T-Zellstimulation hingegen inhibiert membranständiges CD152 die Proliferation von bereits aktivierten T-Zellen (zwei rote Pfeile). Aktivierte, Oberflächen-exprimierende $CD152^+$ T-Zellen werden durch ein CD152-Signal vor Apoptose geschützt (zwei rote Pfeile). Möglich wäre eine Differenzierung dieser Zellen zu Gedächtniszellen.

CD152 inhibiert die Proliferation von bereits aktivierten, proliferierenden T-Zellen und schützt sie vor Apoptose

Eine weitere Funktion kommt CD152 am Tag 2 einer optimalen T-Zellstimulation zu (Maszyna et al., in Revision). Wir konnten erstmals mit einer neuen, sensitiven Färbemethode zeigen, dass zwar fast alle stimulierten T-Zellen CD152 intrazellulär

exprimieren, allerdings nur eine Fraktion der T-Zellen CD152 auch auf die Zelloberfläche bringt. Nach Isolation der Oberflächen-exprimierenden $CD152^+$ Zellen konnte gezeigt werden, dass nur diese Zellen bei Restimulation in ihrer Proliferation inhibiert wurden. In einer weiteren Studie konnten wir zeigen, dass CD152 den Aktivierungs-induzierten Zelltod von aktivierten, $CD152^+$ T-Zellen verhindert (Pandiyan et al., eingereicht). Da es eine grundlegende Voraussetzung der adaptiven Immunantwort ist, dass nach Beendigung einer Immunantwort T-Zellen überleben, die bei einer wiederholten Konfrontation des Organismus mit dem Erreger schneller und effektiver reagieren können, wäre es denkbar, dass die $CD152^+$ T-Zellen Kandidaten für solche Gedächtniszellen darstellen. Obwohl wir bereits erste Anzeichen haben, dass $CD152^+$ T-Zellen Gedächtniszellmarker wie Bcl-2 exprimieren (Pandiyan et al., eingereicht), muss das Differenzierungsschicksal dieser Zellen in weiteren Studien geklärt werden.

Bisher war es sehr schwierig, CD152 mit konventionellen Methoden auf der Oberfläche von T-Zellen zu färben. Wir haben mit einer sensitiven, zytometrischen Färbemethode gezeigt, dass membranständiges CD152 nur auf einer Fraktion von aktivierten T-Zellen vorhanden ist. Unsere Färbung konnten wir funktionell bestätigen, indem wir die $CD152^+$ T-Zellen isoliert haben und diese, im Gegensatz zu den $CD152^-$ T-Zellen, in ihrer Proliferation nach Restimulation mit APZ und Antigen gehemmt waren. In parallelen Studien mit humanen Zellen konnten wir zeigen, dass CD152 noch in 22% der Zellen nach zwei weiteren Tagen auf der Oberfläche war. Die $CD152^-$ T-Zellen hingegen regulierten kaum CD152 hoch (3%). Mit Stimulation wurde sogar auf 50% der isolierten $CD152^+$ T-Zellen CD152 für mindestens 2 Tage stabilisiert. In weiteren Experimenten wird sich zeigen, ob Zellen, die CD152 stabil auf der Oberfläche exprimieren, eine Subpopulation von T-Zellen darstellen und ob sie ein bestimmte Funktion ausführen.

Der molekulare Mechanismus der heterogenen Expression von membranständigem CD152 auf aktivierten T-Zellen wurde bisher nicht geklärt. Da fast alle Zellen CD152 intrazellulär exprimieren, ist ein intrinsischer Mechanismus unwahrscheinlich. Es ist bekannt, dass CD152 Expression durch ein T-Zellrezeptor-Signal induziert und durch CD28- und IL-2-Kostimulation verstärkt wird, was darauf hindeutet, dass eine stochastische Komponente der T-Zellaktivierungsstärke involviert ist. Wir haben gezeigt, dass nach Stimulation der Zellen durch αCD3 und αCD28 und

nachfolgender Kreuzvernetzung von CD152 nur ein Teil der T-Zellen auf das CD152-Signal durch Zellzyklusarrest oder Apoptose-Resistenz reagiert. Somit führt sogar ein homogener Stimulus für die T-Zellen nicht dazu, dass alle T-Zellen CD152 auf die Oberfläche bringen. Ein Faktor scheint entweder nicht oder nicht ausreichend zur Verfügung zu stehen. Wir haben auch gezeigt, dass Th2-Zellen wesentlich weniger CD152 auf der Oberfläche exprimieren als Th1-Zellen, was auf einen Einfluss des Milieus direkt oder indirekt über die APZ hindeutet (Pandiyan et al., eingereicht). Es liegt deshalb nahe zu folgern, dass die Heterogenität der CD152-Expression hauptsächlich durch die Heterogenität der APZs verursacht wird. Eine unterschiedliche Aktivierung von klonalen T-Zellen würde dazu führen, dass eine flexible Population entsteht. Dadurch ist gewährleistet, dass sowohl Pathogene bekämpft, als auch die Immunantwort gedämpft werden könnte, wenn die Stimulation zu stark wird.

CD152 vermittelt direkt Zellzyklusarrest und Resistenz gegen Apoptose in T-Zellen

Die Proliferationsbegrenzung der T-Zellen durch CD152 war ursprünglich allein auf die Inhibition der Expression des autologen, Proliferation-induzierenden Zytokins IL-2 zurückgeführt worden (Chambers et al., 1996). Wir konnten jedoch zeigen, dass CD152 auch die Expression der Zellzyklusregulatoren Zyklin D3, CDK4 und CDK6 hemmt, wobei zumindest die Expression von CDK6 unabhängig von IL-2 ist (Brunner et al., 1999). Die IL-2 unabhängige Inhibition der T-Zellproliferation durch CD152 konnten wir auch bestätigen, da sie sich durch Zugabe von IL-2 nicht aufheben ließ. Ähnlich könnten indirekte Effekte, die durch CD152 vermittelt werden, Apoptose verhindern, z.b. über CD152-vermittelte Reduktion von IL-2 und Zellzyklusarrest (Pushpa et al., eingereicht). Doch weder bei CD152-Signalgebung der T-Zelle in einem Milieu mit IL-2 im Überschuss, noch in Anwesenheit von Zellzyklusinhibitoren konnte die CD152-induzierte Resistenz gegen Apoptose in T-Zellen aufgehoben werden. Der Ausschluss von indirekten Effekten bedeutet, dass die neu von uns beschriebenen Mechanismen von CD152 durch direkte Signaltransduktion von CD152 in die Zelle erfolgen.

Klinische Aspekte

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist eine wichtige Eigenschaft von Immunzellen, um Immunantworten zu verhindern oder sie abzuschalten. Entzündliches Rheuma und andere Autoimmunerkrankungen sind möglicherweise die Folge mangelnder Apoptose. Immunzellen, die körpereigenes Gewebe angreifen, werden nicht abgetötet. Es wird vermutet, dass durch fehlende Apoptose von Immunzellen der autoaggressive Prozess des Immunsystems nicht abgeschaltet werden kann und chronisch wird. Fatalerweise sind T-Zellen aus dem entzündeten Gelenk von Patienten mit Rheumatoider Arthritis resistent gegen Apoptose.
Synoviale T-Zellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis tragen auf ihrer Oberfläche vermehrt das Molekül CD152. Wir konnten zeigen, dass CD152 Resistenz gegen Apoptose in T-Zellen induziert. Dies geschieht, indem ein Signaltransduktionsmolekül, die PI3´Kinase, aktiviert wird. Dies führt zur Inaktivierung von Apoptose-unterstützenden Molekülen (Phosphorylierung von FKHRL1 und Herunterregulation von FasL) und zur Induktion des Apoptose-verhindernden Moleküls Bcl-2. Apoptose konnte in T-Zellen durch Blockade von CD152 (oder PI3´Kinase) induziert werden.
Die Kenntnis, dass T-Zellen durch Hemmung von CD152 wieder sensitiv für Apoptose werden und durch diesen Prozess eliminiert werden, könnte einen Therapieansatz für Rheumatoide Arthritis liefern, indem unerwünschte, entzündliche Immunreaktionen durch programmierten Zelltod abgeschaltet werden. Es wird bereits CD152Ig (CTLA-4Ig) in klinischen Studien eingesetzt und hat gute Ergebnisse erzielt (Moreland et al., 2002). Da CD152Ig die Bindung von CD152 und CD28 an ihre Liganden CD86 und CD80 verhindert, wurde bisher die Funktion darauf zurückgeführt, dass die Stimulation der T-Zellen inhibiert wird, indem das kostimulatorische Signal durch CD28 verhindert wird. Dies mag auch zu einem gewissen Anteil eintreten, doch können bereits aktivierte T-Zellen meist unabhängig von CD28 stimuliert werden. Unsere neuen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass vor allem die Blockade von CD152 durch CD152Ig eine entscheidende Rolle bei der CD152Ig Therapie spielen könnte. Eine direkte Blockade von CD152 wäre allerdings vorzuziehen, da dadurch nicht die Bildung neuer Effektorzellen verhindert würde, die nötig für die Immunabwehr von neuen Infektionen und Tumoren sind.

Literatur

Alegre, M. L., Noel, P. J., Eisfelder, B. J., Chuang, E., Clark, M. R., Reiner, S. L., and Thompson, C. B. (1996). Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol 157*: 4762.

Allison, J.P., Chambers, C.A., Hurwitz, A., Sullivan, T.J., Boittel, B., Fournier, S., Brunner, M., and Krummel, M.F (1998). A role for CTLA-4-mediated inhibitory signals in peripheral T cell tolerance? Immunological Tolerance. Novartis Foundation. John Wiley and Sons, Inc., New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.

Annunziato, F., Galli, G., Cosmi, L., Romagnani, P., Manetti, R., Maggi, E., and Romagnani, S. (1998). Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw 9* : 12.

Aversa, G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Cocks, B. G., and de Vries, J. E. (1997). Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol 158*: 4036.

Bachmann, M. F., Kohler, G., Ecabert, B., Mak, T. W., and Kopf, M. (1999). Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol 163*: 1128.

Bayrak, S., Bregulla, M., Brunner, M.C., Mitchison, N.A., and Schneider, S.C. (1995). New principles in self-tolerance and autoimmunity: First-Past-the-Post, inhibitory cytokines mediating protection by major histocompatibility complex gene, triggered by infection. *Immunol Res* S1:568, S. Karger AG, Basel.

Blair, P. J., Riley, J. L., Levine, B. L., Lee, K. P., Craighead, N., Francomano, T., Perfetto, S. J., Gray, G. S., Carreno, B. M., and June, C. H. (1998). CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol 160*: 12.

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

Brunner, M.C., Schneider, S.C. and Mitchison, N.A. (1994). The integrative activity of the immune system. *Scand J Immunol 40* : 479.

Brunner, M.C., Caput, D., Helbert, M., Mitchison, N.A., Simon, K. and Wu, P. (1992). Regulation of regulatory T-cells. *Progress in Immunology* 7: 627.

Brunner, M.C., Larsen, S., Sette, A. and Mitchison, N.A. (1996). Altered Th1/Th2 balance associated with the immunosuppressive/protective effect of the H-2A^b allele on the response to allo-4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Euro J Immunol 25* 3285.

Brunner, M. C. (1999). Costimulatory molecules and modulation. *The Immunologist 7*: 9.

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.

Chambers, C. A., Krummel, M. F., Boitel, B., Hurwitz, A., Sullivan, T. J., Fournier, S., Cassell, D., Brunner, M., and Allison, J. P. (1996). The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev 153*: 27.

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.

Chen, W., Jin, W., and Wahl, S. M. (1998). Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med 188*: 1849.

Daniel, P. T., Kroidl, A., Cayeux, S., Bargou, R., Blankenstein, T., and Dorken, B. (1997). Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J Immunol 159*: 3808.

Daser, A., Mitchision, H., Mitchision, A., and B. Müller (1996). Non-classical-MHC genetics of immunological diseases in mand and mouse. The key role of pro-inflammatory cytokine genes. *Cytokine 8*: 593.

Del Prete, G., De Carli, M., D'Elios, M. M., Daniel, K. C., Almerigogna, F., Alderson, M., Smith, C. A., Thomas, E., and Romagnani, S. (1995). CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J Exp Med 182*: 1655.

Egen, J.G., and J.P. Allison (2002). CTLA-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity 16*: 23.

Egen, J.G., M.S. Kuhns, and J.P. Allison (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 3: 611.

Flynn, S., Toellner, K. M., Raykundalia, C., Goodall, M., and Lane, P. (1998). CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs

CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med 188*: 297.

Higgins, L. M., McDonald, S. A., Whittle, N., Crockett, N., Shields, J. G., and MacDonald, T. T. (1999). Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J Immunol 162*: 486.

Horspool, J. H., Perrin, P. J., Woodcock, J. B., Cox, J. H., King, C. L., June, C. H., Harlan, D. M., St. Louis, D. C., and Lee, K. P. (1998). Nucleic acid vaccine-induced immune responses require CD28 costimulation and are regulated by CTLA4. *J Immunol 160*: 2706.

Hünig, T., and Schimpl, A. (1997). Systemic autoimmune disease as a consequence of defective lymphocyte death. *Curr Opin Immunol 9*, 826.

Hurtado, J. C., Kim, Y. J., and Kwon, B. S. (1997). Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol 158*: 2600.

Hurwitz, A. A., Sullivan, T. J., Krummel, M. F., Sobel, R. A., and Allison, J. P. (1997). Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol 73*: 57.

Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczek, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature 397*: 263.

Jacob, J., and Baltimore, D. (1999). Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature 399*: 593.

Kim, Y. J., Kim, S. H., Mantel, P., and Kwon, B. S. (1998). Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *Eur J Immunol 28* : 881.

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.

Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *PNAS 89*: 6232.

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

Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B., and Bluestone, J. A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science 282*: 2263.

Lens, S. M., Tesselaar, K., van Oers, M. H., and van Lier, R. A. (1998). Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol 10*, 491.

Letterio, J. J., and Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol 16* : 137.

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

Linsley, P. S., and Ledbetter, J. A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol 11* : 191.

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

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.

Maszyna, F., Kunkel, D., Radbruch, A., Brunner-Weinzierl, M.C. (2003). Diversity of clonal T cell proliferation is mediated by differential expression of CTLA-4 (CTLA-4) on the cell surface of activated individual T lymphocytes *J Immunol 171*:3459.

McCoy, K., Camberis, M., and Gros, G. L. (1997). Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *J Exp Med 186*: 183.

Moreland, L.W., Alten, R., Bosch, F., Appelboom, T., Leon, M., Emery, P., Cohen, S., Luggen, M., Shergy, W., Nuamah, I., and J.-C. Becker (2002). Costimulatory Blockade in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism 46:* 1470.

Moulian, N., and Berrih-Aknin, S. (1998). Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin Immunol 10*: 449.

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.

Pandiyan, P., Gärtner, D., Soezeri, O., Radbruch, A., Schulze-Osthoff, K., Brunner-Weinzierl, M.C. CTLA-4 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3´kinase function. (2004) *J Exp Med*. 199: 831.

Rickert, R. C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res 25*: 1317.

Schwartz, R. H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. Cell *71*, 1065.

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

Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard C., Farber, C.M., Saragosti, S, Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C, Muyldermans, G, Verhofstede, C, Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G., and M. Parmentier (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722.

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.

Tivol, E. A., Boyd, S. D., McKeon, S., Borriello, F., Nickerson, P., Strom, T. B., and Sharpe, A. H. (1997). CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *J Immunol 158*, 5091.

Vinay, D. S., and Kwon, B. S. (1998). Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immun*ol *10*, 481.

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.

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 Ctla-4. *Science 270*: 985.

Watts, T. H., and DeBenedette, M. A. (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol 11*: 286.

Weinberg, A. D., Vella, A. T., and Croft, M. (1998). OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol 10*: 471.

Weiner, H. L., Gonnella, P. A., Slavin, A., and Maron, R. (1997). Oral tolerance: cytokine milieu in the gut and modulation of tolerance by cytokines. *Res Immunol 148*: 528.

Wu, Y., Guo, Y., Huang, A., Zheng, P., and Liu, Y. (1997). CTLA-4-B7 interaction is sufficient to costimulate T cell clonal expansion. *J Exp Med 185*: 1327.

Zheng, P., Wu, Y., Guo, Y., Lee, C., and Liu, Y. (1998). B7-CTLA4 interaction enhances both production of antitumor cytotoxic T lymphocytes and resistance to tumor challenge. *PNAS 95*: 6284.

Danksagung

Die Arbeit wurde in den Laborräumen der University of California, Berkeley, US, im Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin und in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinischer Immunologie der Charité, Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin, durchgeführt. Im Besonderen möchte ich mich bei Prof. J.P. Allison, Prof. N.A. Mitchision, Prof. A. Radbruch und Prof. H.-R. Burmester für die Unterstützung der Arbeit und die Diskussionen der Projekte bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen auf den Publikationen erwähnten, wissenschaftlichen Kooperationspartnern, Studenten und Studentinnen bedanken, die durch Bereitstellung von Reagenzien, Mäusen oder ergänzenden Versuchen ermöglichten, dass die Fragestellungen komplexer bearbeitet werden konnten, als es sonst möglich gewesen wäre.

Die Projekte wurden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, das Bundesministerium für Forschung und Technik, das Bundesministerium für Bildung und Forschung, das DRFZ, die Gemeinnützige Hertiestiftung und die Charité, Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin. Im Besonderen möchte ich mich bei der Kommission zur wissenschaftlichen Nachwuchsförderung der Charité bedanken, die mich seit 2002 durch ein Rahel Hirsch Stipendium bei der Durchführung der Habilitation unterstützt.

Ich möchte mich auch bei Sabine Daugelat, Michael Naumann, Brigitte Müller, Brigitte Boitel, Dana Leach, Angelika Daser, Thomas Ritter und Lisa Mendoza bedanken, die dafür gesorgt haben, dass die Arbeit Spaß macht.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde;

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den14.03.03

(Dr. Monika C. Brunner-Weinzierl)