

Aus der Universitätskinderklinik, Abteilung für Pädiatrische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Bedeutung von CTLA-4 für IL-17-bildende CD8⁺ T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Jonas Pick

aus Berlin

Magdeburg 2020

1 Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Pick, Jonas:

Die Bedeutung von CTLA-4 für IL-17-bildende CD8⁺ T-Zellen.

- 2020. - 89 Bl., 18 Abb., 1 Anl.

Kurzreferat

CTLA-4 spielt als immunmodulatorischer Korezeptor von T-Zellen eine zentrale Rolle in der Therapie maligner und autoimmuner Erkrankungen. Es ist bekannt, dass CTLA-4 neben der T-Zell-Aktivierung auch selektiv die Differenzierung von CD8⁺ Tc1-Zellen kontrolliert, indem zentrale Tc1-Faktoren wie Eomes, IFN- γ und Granzyme B inhibiert und die Zytotoxizität vermindert werden. Die Bedeutung von CTLA-4 für CD8⁺ Tc17-Zellen war bisher unbekannt. Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass CTLA-4-vermittelte Signale die Tc17-Differenzierung zell-intrinsisch unterstützten und so eine erhöhte Tc17-Qualität vermittelten. Dieser Effekt war von einer erhöhten Expression des zentralen Tc17-Transkriptionsfaktors ROR γ t sowie weiterer Tc17-fördernder Faktoren begleitet und mit einer erhöhten Stabilität des Tc17-Phänotyps sowohl in-vitro als auch in-vivo assoziiert. CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen zeigten im Vergleich zu CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen eine erniedrigte Expression von Tc17-Transkriptionsfaktoren, eine gesteigerte Plastizität und folglich eine erhöhte Zytotoxizität in-vivo und in-vitro. In einem *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine verstärkte Konversion in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp mit hoher LM-Immunität, die mit Tc1-Zellen vergleichbar und mit erhöhten Anzahlen an polyfunktionalen IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ CD8⁺ T-Zellen assoziiert war. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erweitern das Wissen über die Bedeutung CTLA-4s für die T-Zell-Differenzierung. Sie könnten bei der iatrogenen Beeinflussung CTLA-4s im Rahmen der Therapie maligner Erkrankungen (z.B. durch anti-CTLA-4) helfen, das Verständnis zugrundeliegender Wirkmechanismen und Therapieerfolge zu steigern.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Eur J Immunol. 2014 Jul;44(7):2139-52.

CTLA-4 (CD152) enhances the Tc17 differentiation program.

Pick J, Arra A, Lingel H, Hegel JK, Huber M, Nishanth G, Jorch G, Fischer KD, Schlüter D, Tedford K, Brunner-Weinzierl MC.

Oncoimmunology. 2017; (6): e1273300.

The differentiation and plasticity of Tc17 cells are regulated by CTLA-4-mediated effects on STATs.

Arra A, Lingel H, Kuropka B, Pick J, Schnoeder T, Fischer T, Freund C, Pierau M, Brunner-Weinzierl MC

2 Schlüsselwörter

CD8⁺ T-Zellen, Lymphozyten, CTL, Tc1, Tc17, CTLA-4, IL-17, IFN- γ , ROR γ t, Ipilimumab, anti-CTLA-4

3 Inhaltsverzeichnis

1	Dokumentationsblatt	2
2	Schlüsselwörter	2
3	Inhaltsverzeichnis	3
4	Abbildungsverzeichnis	6
5	Abkürzungsverzeichnis	7
6	Einführung	11
6.1	Das humane Immunsystem und seine Einteilung	11
6.2	Die ontogenetische Entstehung der T-Lymphozyten	11
6.3	Aktivierung von T-Zellen	12
6.3.1	Antigenpräsentierende Zellen	12
6.3.2	CD8 ⁺ T-Zellen	13
6.3.3	CD4 ⁺ T-Zellen	14
6.4	Molekulare Mechanismen der T-Zell-Aktivierung	15
6.5	Klonale Expansion, Kontraktion und Gedächtniszellbildung	15
6.6	Differenzierung von CD8 ⁺ T-Zellen und ihre Effektormechanismen	16
6.6.1	Tc1-Zellen	17
6.6.2	Tc2-Zellen	17
6.6.3	Regulatorische T-Zellen (Treg)	17
6.6.4	Tc17-Zellen	17
6.7	Funktionen von Tc17-Zellen	19
6.8	Die Plastizität von Tc17-Zellen	20
6.9	Die transkriptionelle Regulation der Tc17-Zellen	21
6.10	An der Tc17-Differenzierung beteiligte Kofaktoren	21
6.11	CTLA-4 (CD152)	22
6.12	Einfluss von CTLA-4 auf die T-Zell-Aktivierung	23
6.13	Einfluss von CTLA-4 auf die T-Zell-Differenzierung	23
6.14	Die medizinische Bedeutung von CTLA-4	23
6.14.1	Anti-CTLA-4 in der Tumorthherapie	23
6.14.2	Kombinationstherapien	25
6.14.3	CTLA-4-Ig in der Therapie autoimmuner Erkrankungen	26
7	Material, Versuchstiere und Methoden	27
7.1	Materialien und Versuchstiere	27
7.1.1	Geräte	27
7.1.2	Kunststoff- und Zellkulturartikel	28
7.1.3	Puffer, Zellkulturmedien	28
7.1.4	Antikörper, Zytokine, Chemikalien	28
7.1.5	Versuchstiere/Mäuse	29

7.2	Methoden.....	30
7.2.1	Zellgewinnung und -Sortierung.....	30
7.2.2	Zellkulturen.....	30
7.2.3	Durchflusszytometrie (FACS; engl.: fluorescence activated cell sorting).....	31
7.2.4	Zellfärbungen für die Durchflusszytometrie.....	31
7.2.5	Ko-Kulturen.....	32
7.2.6	Cytometric bead assay (CBA).....	33
7.2.7	Realtime-PCR.....	33
7.2.8	In-vivo Experimente (Listeria monocytogenes-Infektionsmodell).....	33
7.2.9	Statistik.....	34
8	Ergebnisse.....	35
8.1	Naive CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} OT.1-Zellen zeigen eine ähnliche Expression von Aktivierungs-induzierten Rezeptoren und Zytokinen.....	35
8.2	CTLA-4 ^{+/+} Tc17-Zellen produzieren mehr IL-17 als CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen.....	35
8.3	Weder CTLA-4 ^{+/+} noch CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen bilden detektierbare Mengen an IL-4, Foxp3, IL-10 oder Granzyme B.....	37
8.4	IL-2 und IFN- γ sind nicht für die unterschiedliche Bildung von IL-17 in CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen verantwortlich.....	38
8.5	CTLA-4 vermittelt über T-Zell-intrinsische Mechanismen die Verstärkung der IL-17-Bildung.....	40
8.6	Proliferation und Apoptose sind vergleichbar in aktivierten CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen.....	41
8.7	Der CTLA-4-vermittelte Effekt auf Tc17-Zellen ist unabhängig von einer distinkten TZR-Stimulation.....	42
8.8	CTLA-4 erhöht die IL-17-Bildung pro Tc17-Zelle und fördert die Expression Tc17-relevanter Faktoren.....	43
8.9	CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine erhöhte Plastizität und Konversion zu einem Tc1-ähnlichen Phänotyp.....	45
8.10	Ein Listerien-Infektionsmodell zum Vergleich der Immunantworten von CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen.....	46
8.11	CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine mit Tc1-Zellen vergleichbare, effektive Listerien-Abwehr in-vivo.....	47
8.12	CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen nach Transfer eine erhöhte Koexpression von Zytokinen.....	49
8.13	CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen in-vitro eine erhöhte Zytotoxizität.....	50
9	Diskussion.....	51
9.1	CTLA-4 verstärkt spezifisch die IL-17-Bildung über einen zell-intrinsischen Mechanismus.....	51
9.2	Die CTLA-4-vermittelten Unterschiede in der IL-17-Bildung beruhen nicht auf distinkten TZR- oder CD28-Signalen.....	52
9.3	Apoptose- und Proliferationsverhalten beeinflussen nicht die CTLA-4-vermittelte IL-17-Bildung.....	53

9.4	CTLA-4 induziert die Expression zentraler Tc17-Faktoren in Tc17-Zellen	53
9.5	CTLA-4 bewirkt einen höheren Differenzierungsgrad in Tc17-Zellen	55
9.6	CTLA-4-Signale stabilisieren den IL-17 ⁺ Tc17-Phänotyp nach Restimulation in-vitro	57
9.7	CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine mit Tc1-Zellen vergleichbare Zytotoxizität gegen Listeria monocytogenes	58
9.8	CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen aufgrund gesteigerter Plastizität einen zytotoxischen Phänotyp	59
9.9	Plastische CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen sind keine konventionellen Tc1-Zellen.....	60
9.10	Unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber Zytokinen als bestimmender Faktor für die Plastizität	61
9.11	Langzeit-Immunität und Gedächtniszellbildung	61
9.12	Mögliche Implikationen für die CTLA-4-Blockade in der Tumorthherapie	63
9.13	Herausforderungen für die Immuncheckpoint-Inhibitoren	65
10	Zusammenfassung.....	69
11	Literaturverzeichnis.....	70
12	Danksagung	85
13	Ehrenerklärung.....	86
14	Darstellung des Bildungsweges.....	87
15	Anlagen.....	89

4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung sowie kostimulatorischer Einflüsse von CD28 und CTLA-4	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung der CD8 ⁺ T-Zell-Differenzierung und Gedächtniszellbildung	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Tc17-Differenzierung und beteiligter Faktoren	18
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Kontrolle der CD90 ⁻ -Anreicherung per MACS.....	30
Abbildung 5: Illustration zum Ansetzen der Ko-Kulturen.....	32
Abbildung 6: Schematischer Ablauf des LM-Infektionsversuches	34
Abbildung 7: Phänotypische Ähnlichkeit naiver CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} OT.1-Zellen	35
Abbildung 8: IL-17-, IFN- γ - und TNF- α -Bildung von CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen	36
Abbildung 9: Phänotypischer Vergleich von CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen	38
Abbildung 10: Der Einfluss von CTLA-4 auf die Tc17-Differenzierung ist unabhängig von IFN- γ und IL-2.....	39
Abbildung 11: CTLA-4 verstärkt T-Zell-intrinsisch die IL-17-Bildung.....	41
Abbildung 12: CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen ein ähnliches Proliferations- und Apoptoseverhalten	42
Abbildung 13: CTLA-4 ^{+/+} Tc17-Zellen zeigen eine verstärkte Expression Tc17-relevanter Faktoren.....	44
Abbildung 14: CTLA-4 stabilisiert den Tc17-Phänotyp in-vitro	45
Abbildung 15: Listeria monocytogenes-Immunität von CTLA-4 ^{+/+} und CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen	48
Abbildung 16: CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine stärkere polyfunktionale Zytokinbildung	49
Abbildung 17: Erhöhte In-vitro-Zytotoxizität von CTLA-4 ^{-/-} Tc17-Zellen	50
Abbildung 18: Modell zur möglichen Wirkung von anti-CTLA-4 auf T-Zellen im Mikromilieu des Tumors	64

5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AICD	Activation induced cell death (Aktivierungs-induzierter Zelltod)
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
B7-1	= CD80
B7-2	= CD86
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BZR	B-Zell Rezeptor
C	Celsius
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CBA	Cytometric bead assay
CD	Cluster of differentiation
CD80	= B7-1
CD86	= B7-2
CD152	= CTLA-4
cDNA	Komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester
CFU	Colony forming units (koloniebildende Einheiten)
CTL	Zytotoxische CD8 ⁺ T-Zelle
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (= CD152)
CTLA-4-Ig	CTLA-4-Immunglobulin-Fusionsprotein
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated nuclease 9
Cy5	Cyanin-5
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Engl.	Englisch
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
Fas/FasL	Fas/Fas-Ligand
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FOXP3	Forkhead box P3
h	Stunde(n)
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPLC	High performance liquid chromatography
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule
ICOS	Inducible co-stimulator
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iMFI	Integrierte MFI
IRF-4	Interferon regulatory factor 4
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
i.v.	Intravenös
JAK	Janus-Kinase
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
LM	Listeria Monocytogenes
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic cell sorting (Magnetische Zellsortierung)
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MFI	Median fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MPEC	Memory precursor effector cells
mRNA	Messenger RNA
nd	Nicht detektierbar
NFAT	Nuclear factor of activated T cells

NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSCLC	Non-small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
ns	Nicht signifikant
OT.1	TZR-transgene Mauslinie, die MHC- I-restrikierte Ovalbumin-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen bildet
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	MHC-I-restriktiertes Peptidepitop des Ovalbumins (OVA) mit der Sequenz SIINFEKL, welches eine spezifische Aktivierung von CD8 ⁺ OT.1-Zellen erlaubt.
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death protein 1-Ligand
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbolmyristat-Acetat
PRR	Pattern recognition receptors
RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ t	RAR-related orphan receptor gamma
RT-PCR	Realtime-PCR
Runx	Runt-related transcription factor
SHP-2	SH2-containing tyrosine phosphatase
SLEC	Short-lived effector cells
SOCS	Suppressor of cytokine signaling proteins
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tc	Zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen
Tg	Transgen
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th	CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TNFR-1	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (=CD120a)

Treg	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell Rezeptor
VDJ	V-variable, D-diversity, J-joining
VISTA	V domain-containing Ig suppressor of T-cell activation

6 Einführung

6.1 Das humane Immunsystem und seine Einteilung

Die körperliche Unversehrtheit ist durch körperfremde (belebte oder unbelebte Noxen) sowie körpereigene Faktoren, wie z.B. entartete Zellen, bedroht. Deshalb ist nicht nur eine effektive Unterscheidung von „Fremd“ und „Selbst“, sondern ferner von gesund und krankhaft notwendig. Zu diesem Zwecke verfügt der Mensch über ein komplexes Abwehrsystem, das aus einem angeborenen (unspezifischen) und einem erworbenen (spezifischen/adaptiven) Teil besteht. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch alt und von Geburt an vorhanden. Die Immunantwort wird innerhalb von Stunden initiiert, da die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) anhand von nicht-klonalen Rezeptoren (engl.: Pattern recognition receptors; PRR) ein breites Spektrum von Mikroorganismen anhand evolutionär konservierter molekularer Muster (engl.: pathogen associated molecular patterns; PAMP) ohne vorherige Exposition erkennen können. Durch die humoralen Komponenten wie antimikrobielle Peptide, lösliche Botenstoffe (Zytokine) und das Komplementsystem wird die angeborene Abwehr komplementiert. Das erworbene Immunsystem besteht vor allem aus den T- und B-Lymphozyten, die spezifische Antigen-Rezeptoren (T-Zell-Rezeptor (TZR) bzw. B-Zell-Rezeptor (BZR)) exprimieren. Für die Einleitung einer Immunantwort ist das Erkennen eines passenden Antigens nötig, das in autologen MHC- (engl. major histocompatibility complex) bzw. HLA-Molekülen (Humanes Leukozyten Antigen) präsentiert werden muss (MHC-Restriktion), weshalb die Immunantwort erst einige Tage nach primärem Antigenkontakt eintritt. Während T- und B-Lymphozyten die zellulären Bestandteile des erworbenen Immunsystems darstellen und über zellvermittelte Abwehrmechanismen verfügen, gewährleisten die von Plasmazellen gebildeten Immunglobuline den humoralen Anteil des erworbenen Immunsystems. Im Gegensatz zur angeborenen Abwehr ist die erworbene Immunität in der Lage, durch Gedächtniszellen und Antikörper ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, um im Falle eines sekundären Antigenkontaktes eine schnellere und effektive Immunität sicherzustellen. Eine weitere bedeutsame Eigenschaft des erworbenen Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“: Allo gene bzw. xenogene MHC-Moleküle werden als fremd erkannt und lösen eine Immunantwort aus, was z.B. bei Transplantatabstoßungen eintreten kann.

6.2 Die ontogenetische Entstehung der T-Lymphozyten

Jede reife T-Zelle exprimiert ausschließlich TZR mit identischer Antigen-Spezifität. Der TZR ist ein heterodimeres Transmembranprotein, das aus einer α - und einer β -Kette besteht. Je Kette gibt es einen konstanten sowie einen variablen Anteil, der für die Antigenbindung verantwortlich ist und

durch verschiedene V-, D- und J-Gene kodiert wird. Durch ein Re-Arrangement dieser VDJ-Gensegmente der Keimbahn-DNA (sog. genetische Rekombination) wird während der T-Zell-Reifung im Thymus eine Vielfalt von ca. 10^{18} möglichen TZR-Spezifitäten geschaffen. Im weiteren Reifungsprozess werden aus $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen diejenigen selektiert, die Selbst-MHC-Moleküle über eine Interaktion des TZR und der Korezeptoren CD4/CD8 mit den MHC-Klasse-I- bzw. -II-Molekülen von kortikalen Epithelzellen des Thymus erkennen (positive Selektion). Dabei werden T-Zellen mit zu starker oder fehlender Interaktion apoptotisch (negative Selektion). Die Elimination von potenziell autoimmunen T-Zellen wird als klonale Deletion bezeichnet und trägt zur Ausbildung einer zentralen Toleranz bei. Abhängig von der Signalstärke und -länge entwickeln sich die CD4/CD8-exprimierenden Zellen zu einfach positiven $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen und zirkulieren nach abgeschlossener Reifung über die Blutbahn in die sekundären lymphatischen Organe. Mäuse können gentechnisch verändert werden, dass eine eingefügte Kombination der Gensegmente den variablen Anteil des TZR determiniert. Durch allele Exklusion exprimieren alle T-Zellen dieser Mäuse einen identischen TZR und lassen sich daher gezielt durch ein entsprechendes Antigen aktivieren (s. 7.1.5 Versuchstiere/Mäuse).

6.3 Aktivierung von T-Zellen

6.3.1 Antigenpräsentierende Zellen

Antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie Dendritische Zellen und Makrophagen können entartete oder infizierte Zellen sowie Mikroorganismen phagozytieren, jedoch auch selbst infiziert werden. Vor allem Dendritische Zellen spielen bei der T-Zell-Aktivierung eine zentrale Rolle. Exogene Antigene können nach intrazellulärer Verarbeitung sowohl auf MHC-II als auch auf MHC-I-Moleküle geladen und an T-Zellen präsentiert werden (sog. „Cross-Priming“ [1]). Die APZ wandern vom Ort der Infektion über afferente Lymphgefäße in regionale Lymphknoten und exprimieren dabei im Rahmen eines Reifungsprozesses MHC- und kostimulatorische Moleküle wie CD80/86. Die Reifung wird dadurch verstärkt, dass APZ mittels PRR zusätzlich auf im Mikromilieu anfallende, evolutionär konservierte Bestandteile von Krankheitserregern (wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA)) reagieren. Aktivierte APZ sezernieren diverse Zytokine, die Immunantworten und die Migration von anderen Zellen der angeborenen und erworbenen Abwehr steuern und stellen demzufolge ein entscheidendes und dynamisches Bindeglied zwischen beiden Abwehrsystemen dar. In den Lymphknoten kommen APZ mit zirkulierenden T-Zellen in Kontakt (lymphogener Antigenkontakt). Neben den Lymphknoten findet auch in der Milz (hämatogener Antigenkontakt) sowie in den Schleimhäuten (MALT; engl. mucosa associated lymphatic tissue) ein Kontakt mit T-Zellen statt.

6.3.2 CD8⁺ T-Zellen

Um aktiviert werden zu können, muss eine naive CD8⁺ T-Zelle mit ihrem TZR an das passende, MHC-I-präsentierte Antigen auf APZ binden. Gleichzeitig bindet der CD8-Korezeptor an MHC-I-Moleküle. MHC-I-Moleküle sind Membranproteine, die von allen zellkernhaltigen Zellen exprimiert werden und Peptid-Bruchstücke der intrazellulär synthetisierten Proteine als Antigene präsentieren. CD8⁺ T-Zellen können deshalb Peptidstrukturen virusinfizierter oder transformierter Zellen erkennen und diese nach vollständiger Aktivierung über verschiedene Mechanismen bekämpfen (s. 6.6 Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen und ihre Effektormechanismen). Außer dieses ersten TZR/CD8⁺-Korezeptor-Signals bedarf es eines zweiten, kostimulatorischen Signals durch die Wechselwirkung von CD28 auf der T-Zell-Oberfläche und den B7-Molekülen CD80/86 (Abb. 1), die auf aktivierten APZ hochreguliert sind. Die temporäre Kontaktstelle zwischen T-Zelle und APZ wird als immunologische Synapse bezeichnet. Für eine vollständige CD8⁺ T-Zell-Aktivierung mit klonaler Expansion und Gedächtniszellbildung sind zusätzliche, „dritte“ Signale nötig [2]: Proinflammatorische Zytokine wie IL-12 oder Typ I-Interferone, die von aktivierten APZ ausgeschüttet werden, erfüllen diese Funktion bei zytotoxischen CD8⁺ Tc1-Zellen, indem sie über JAK/STAT-vermittelte Signaltransduktionskaskaden die Differenzierung und Effektorfunktionen fördern. Bei IL-17-bildenden CD8⁺ T-Zellen (s. 6.6.4 Tc17-Zellen) übernehmen wahrscheinlich andere Zytokine wie IL-21 diese Funktion [3]. Für eine vollständige CD8⁺ T-Zell-Aktivierung ist außerdem die Hilfe von CD4⁺ T-Zellen nötig (s. 6.3.3 CD4⁺ T-Zellen), die mit APZ und CD8⁺ T-Zellen interagieren [4]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch Interaktionen zwischen CD8⁺ T-Zellen von Bedeutung sind und diese ebenfalls untereinander immunologische Synapsen ausbilden können [5]. Dies verdeutlicht, dass die T-Zell-Aktivierung und die Ausbildung differenzierter Effektorfunktionen ein dynamischer und komplexer Prozess ist, der von der Dauer und Stärke der TZR-Stimulation, kostimulatorischen Faktoren sowie vom vorherrschenden zellulären und humoralen Mikromilieu abhängig ist [2],[6],[7].

Verschiedene Mechanismen sorgen dafür, dass nur adäquate, immunogene Antigene eine vollständige Aktivierung von reifen T-Zellen auslösen können (periphere Toleranz). Hierzu zählen die Ausbildung einer funktionellen Nicht-Reaktivität bei unvollständiger Aktivierung der T-Zellen (Anergie), der Aktivierungs-induzierte Zelltod (engl.: activation induced cell death; AICD) sowie die aktive Suppression durch regulatorische T-Zellen.

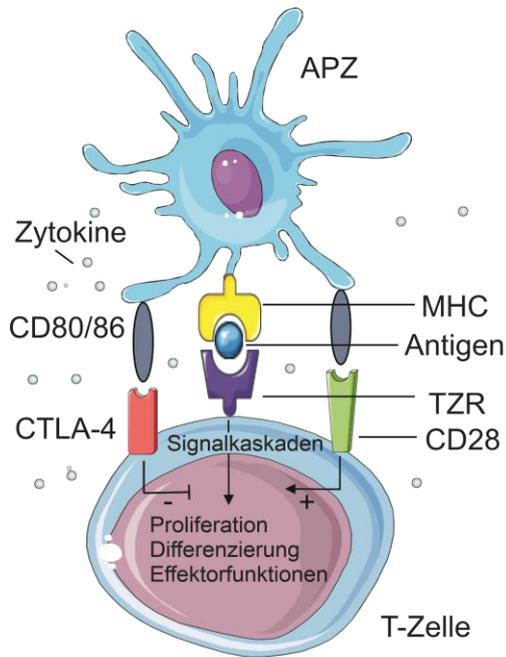


Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung sowie kostimulatorischer Einflüsse von CD28 und CTLA-4

Extrazelluläre Signale werden über den TZR sowie die Korezeptoren CD28 (aktivierend) und CTLA-4 (inhibierend, erst nach T-Zell-Aktivierung exprimiert) über ein Netzwerk aus Kinasen und Phosphatasen in intrazelluläre Signalkaskaden transduziert, die die Aktivierung und Effektorfunktionen der T-Zellen steuern. CD3 und CD8 wurden in der Abbildung aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt. Grafische Elemente wurden mit Hilfe der Vorlagen von Servier Medical Art erstellt (www.servier.de/medicalart).

6.3.3 CD4⁺ T-Zellen

MHC-II-Moleküle auf Zelloberflächen von Dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen präsentieren internalisierte, prozessierte Antigene oder infektiions-assoziierte Antigene, welche von CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) über den TZR/CD4-Korezeptor-Komplex erkannt werden. Je nach Pathogen sowie den Stimulationsbedingungen kommt es zur Aktivierung der Th-Zellen mit Differenzierung in verschiedene Subtypen (Th1, Th2, Th17 oder Treg). Dabei induzieren intrazelluläre Pathogene v.a. eine Th1-Antwort, die zu einer Aktivierung infizierter Makrophagen und der Bildung von IgG-Antikörpern durch B-Zellen führt. Extrazelluläre Erreger rufen meist eine Th2-Antwort hervor, wodurch verstärkt die Bildung von IgM, IgA und IgE von aktivierten B-Zellen angeregt wird. Th17-Zellen bilden IL-17A, IL-17F sowie IL-22 und sind für die Schleimhautimmunität gegen Bakterien- und Pilzinfektionen von Bedeutung [8].

Eine weitere, wichtige Eigenschaft von T-Helfer-Zellen ist, dass sie indirekt eine vollständige Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen unterstützen (s. 6.3.2 CD8⁺ T-Zellen). Dies geschieht über eine Interaktion mit Dendritischen Zellen, was die APZ-Reifung begünstigt und so eine effizientere Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen ermöglicht (sequentielles „Zwei-Zellen-Modell“ [9]). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine zeitgleiche, dreifache zelluläre Interaktion zwischen CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen sowie Dendritischen Zellen stattfindet und Zytokin-(IL-2, IL-12 [4]) bzw. CD40-CD40L-vermittelt [2],[4] zu einer verstärkten CD8⁺ T-Zellaktivierung, [4] führen kann („Drei-Zellen-Modell“ [9]).

6.4 Molekulare Mechanismen der T-Zell-Aktivierung

Der TZR ist nach Antigen-Bindung aufgrund der fehlenden intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität nicht in der Lage, selbstständig eine Signaltransduktion zu initiieren. Hierfür wird der CD3-Korezeptor-Komplex benötigt, der aus zwei Heterodimeren (δ/ϵ bzw. γ/ϵ) und einem Homodimer (ζ/ζ) besteht. Nur der gesamte Komplex aus TZR/CD3/ ζ , der nicht-kovalent in Funktionsplattformen (sog. Lipid-Raft-Inseln) in der Zellmembran zusammengelagert ist, kann eine intrazelluläre Signaltransduktion auslösen. Die Dimere des CD3-Komplexes besitzen konservierte, zytoplasmatische Aminosäure-Sequenzen (sog. ITAMs; engl.: immunoreceptor-tyrosine based activation motifs), die von membran-assoziierten Kinasen der src-Familie phosphoryliert werden. In der Folge lagern sich weitere Kinasen an die phosphorylierten ITAMs, die ein komplexes Netzwerk aus Kinasen, Phosphatasen, Korezeptoren und Adapterproteinen initiieren, welches in seiner Gesamtheit als TZR-Signalsom bezeichnet wird. Dieser Komplex transduziert extrazelluläre in intrazelluläre Signale, die letztendlich im Zellkern die Gentranskription regulieren und so die T-Zell-Funktionen, wie Proteinsynthese, Ausbildung immunologischer Synapsen, Veränderungen im Zytoskelett und Vesikelapparat steuern. Für die Stärke der TZR-Aktivierung sind auch die MHC-Dichte, die Stärke der CD28-Kostimulation sowie die Anzahl der durch einen Liganden quervernetzten TZR wichtig [2].

6.5 Klonale Expansion, Kontraktion und Gedächtniszellbildung

Nach der Aktivierung naiver T-Zellen kommt es im sekundär lymphatischen Gewebe zu einer starken T-Zellproliferation (klonale Expansion), wodurch die Anzahl antigen-spezifischer T-Zellen zunimmt und diese selektiert werden (Abb. 2). Bei einer Immunantwort auf ein Pathogen kommt es durch die Vielzahl an Epitopen stets zu einer polyklonalen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. Um eine Kontrolle der Immunantwort zu gewährleisten, nimmt die Zahl der proliferierten T-Effektorzellen (sog. SLEC; engl.: short-lived effector cells) durch Apoptose (vor allem durch AICD) wieder ab. Andere T-Zellen entwickeln sich über Vorstufen (sog. MPECs; engl.: memory precursor effector cells) in langlebige CD8⁺ T-Gedächtniszellen, die eine langfristige Immunität gegen das entsprechende Antigen sicherstellen. Für ihre Homöostase sind neben verschiedenen Apoptose-regulierenden Faktoren wie bcl-2 auch überlebensfördernde Zytokin-Rezeptoren, wie IL-7R und IL-15R sowie die moderate Interaktion des TZR mit Selbst-AG-MHC-Komplexen notwendig [10]. Während kurzlebige Effektorzellen (SLEC) verstärkt KLRG-1 (engl.: killer cell lectin-like receptor G1) exprimieren (IL-7R^{low} KLRG-1^{high}), weisen MPECs typischerweise einen IL-7R^{high} KLRG-1^{low} Phänotyp auf [11]–[14] und können so voneinander unterschieden werden (Abb. 2). Bezüglich der T-Zell-Differenzierung und Gedächtniszell-Entstehung gibt es verschiedene Modelle. Das lineare Differenzierungsmodell geht davon aus, dass Gedächtniszellen eine sequentielle Weiterentwicklung früherer T-Zellstufen darstellen, also aus ehemaligen T-Effektorzellen entstehen [15].

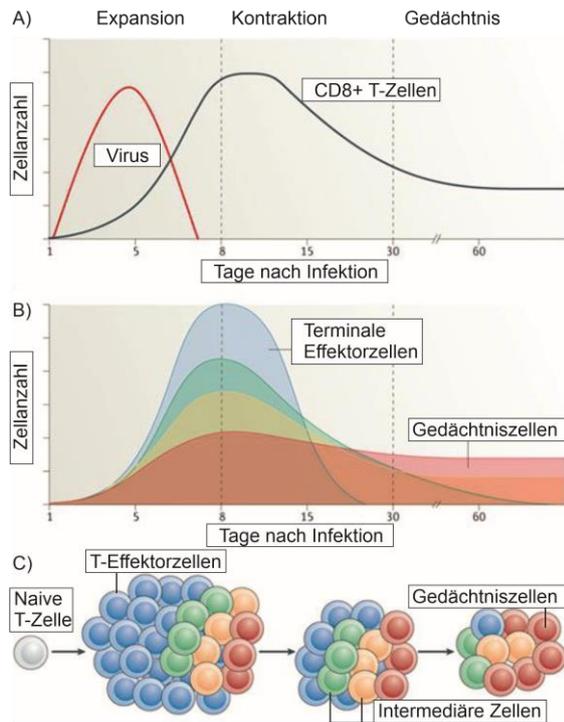


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CD8⁺ T-Zell-Differenzierung und Gedächtniszellbildung

Adaptiert von Kaech et. al, "Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation" [13]. (A) Nach initialer Proliferation (Expansion) kommt es nach Eliminierung des Pathogens zu einer Abnahme der Effektorzellen durch Apoptose (Kontraktion). Ein kleiner Teil der Effektorzellen persistiert als Gedächtniszellen. (B-C) Modellhafte Darstellung der Subtypen von Effektorzellen im zeitlichen Verlauf: Kurzlebige terminale Effektorzellen (blau) exprimieren KLRG-1, jedoch kaum IL-7R und bcl-2. Langlebige Gedächtniszellen (rot) bilden kaum KLRG-1, dafür viel IL-7R und bcl-2. Es existieren außerdem intermediäre Zelltypen (hell-grün; orange).

Im Gegensatz dazu gehen andere Modelle von einem verzweigten Differenzierungsweg aus, d.h. dass sich die Entwicklungswege der T-Effektor- bzw. T-Gedächtniszellen schon früh voneinander trennen [15]. Die Modelle haben gemeinsam, dass bereits die initialen Primärstimulations-Bedingungen (wie Dauer und Stärke der TZR-Stimulation, der Einfluss kostimulatorischer Rezeptoren wie CTLA-4 und CD28, das Mikromilieu und Zytokine wie IFN- γ [16]) von großer Bedeutung für das spätere Schicksal der T-Zellen sind [13]. Auch die Transkriptionsfaktoren T-Bet und Eomes sind an der Entscheidung zwischen kurzlebiger Effektorzelle und langlebiger Gedächtniszelle beteiligt [11],[13],[17] und für die IL-15-vermittelte homöostatische Proliferation der Gedächtniszellen bedeutend [13].

6.6 Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen und ihre Effektormechanismen

Nach der Aktivierung von T-Zellen entstehen funktionell unterschiedliche Subpopulationen von T-Effektorzellen, die durch ihre gebildeten Zytokine definiert werden. Vergleichbar mit CD4⁺ T-Zellen lassen sich ebenfalls distinkte CD8⁺ T-Subpopulationen nachweisen [18],[19]. Die jeweiligen Differenzierungsrichtungen hemmen sich gegenseitig und stabilisieren sich selbst durch positive Rückkopplungsmechanismen. In-vitro kann die Differenzierung durch Hinzugabe bzw. Neutralisation von polarisierenden Zytokinen gezielt induziert werden. In-vivo wird die Differenzierungsrichtung durch die Art des Immunogens sowie das zelluläre und humorale Mikromilieu (u.a. über die Wirkung auf Zytokin- und Toll-like Rezeptoren (TLR)) determiniert [20].

6.6.1 Tc1-Zellen

Werden naive CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit polarisierender Zytokine in-vitro aktiviert, entwickeln sie sich zu „klassischen“ zytotoxischen Tc1-Effektorzellen (sog. CTL, engl.: cytotoxic lymphocytes), die durch Bildung von IFN- γ , Granzyme B, aber auch IL-12 und IL-27 (ein Zytokin der IL-12-Familie) gekennzeichnet sind [21],[22]. Neben IFN- γ fördern IL-2 und IL-12 (parakrin und autokrin) über ihre entsprechenden Rezeptoren die Tc1-Polarisierung durch eine Phosphorylierung von STAT-1, -4 und -5 [23]. Tc1-Zellen bekämpfen entartete Zellen sowie intrazelluläre Pathogene wie Viren und intrazelluläre Bakterien. Dabei können sie sowohl direkt über Zell-Zellkontakte (Bindung von Fas (CD95) oder TNFR-1 (CD120a)), als auch indirekt über ausgeschüttete Zytotoxizitätsfaktoren apoptotisch auf die Zielzelle wirken. Für die Lyse von Zielzellen bilden Tc1-Zellen Perforine und Granzyme B, die in intrazellulären Granula gespeichert werden und nach Ausschüttung in die immunologische Synapse Poren in der Zellmembran der Zielzelle bilden. Granzyme können so in virusinfizierte oder entartete Zellen eindringen und Caspasen-vermittelt Apoptose einleiten.

6.6.2 Tc2-Zellen

Tc2-Zellen bilden IL-4, IL-5 sowie IL-13 und werden durch IL-4 v.a. STAT-6-abhängig induziert [18]. Der zentrale Transkriptionsfaktor ist GATA3. CD4⁺ Th2-Zellen sind an der Abwehr von parasitären Infektionen beteiligt sowie mit Allergien und atopischen Krankheiten wie Asthma bronchiale assoziiert [24]. Über die Funktion von Tc2-Zellen existieren nur wenige Daten [25]. Bisher konnten Tc2-Zellen in-vivo bei allergischen Entzündungsreaktionen z.B. im Respirationstrakt nachgewiesen werden [25].

6.6.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Vergleichbar mit CD4⁺ Treg-Zellen konnten durch eine kontinuierliche Antigen-Stimulation Foxp3-exprimierende CD8⁺ T-Zellen induziert werden, die immunregulatorische Funktionen besitzen und u.a. IL-10 und TGF- β sezernieren [26]. Es sind jedoch auch andere Subtypen von regulatorischen CD8⁺ T-Zellen bekannt, deren Funktion vom Transkriptionsfaktor Helios abhängig ist und die mit ihrem TZR eine Qa-1-Restriktion aufweisen (ein MHC-I b/HLA-E Molekül, das u.a. von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und APZ exprimiert wird) [27],[28]. Dieser Subtyp trägt zur peripheren Toleranz und zum Schutz vor Autoimmunerkrankungen bei, indem Autoantigen-präsentierende Immunzellen supprimiert oder lysiert werden [27],[28].

6.6.4 Tc17-Zellen

Vergleichbar mit IL-17 bildenden CD4⁺ T-Zellen (Th17-Zellen) [8],[29] sind Tc17-Zellen eine Gruppe von CD8⁺ T-Zellen, die durch die Bildung von IL-17, IL-21 und IL-22 charakterisiert ist [19]. Sie besitzen im Gegensatz zu Tc1-Zellen einen „nicht-zytotoxischen“ Phänotyp, der durch eine stark verminderte

IFN- γ -, Granzyme B- und Perforin-Expression sowie eine reduzierte Zytotoxizität gekennzeichnet ist [19],[30],[31]. In-vitro werden Tc17-Zellen durch TGF- β und proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-21 induziert sowie durch IL-23 in ihrem Phänotyp stabilisiert [30],[32] (Abb. 3). Die proinflammatorischen Zytokine unterdrücken Foxp3 (das ebenfalls durch TGF- β induziert wird), um eine Tc17-Differenzierung zu ermöglichen [33],[34]. Es gibt Hinweise auf eine gewisse Redundanz der beteiligten Zytokine, so dass IL-1 β unter bestimmten Bedingungen TGF- β ersetzen kann [35]. Obwohl zahlreiche Tc17-induzierende Zytokin-Kombinationen getestet und optimiert wurden, lassen sich geringe Anteile an IFN- γ^+ oder IL-17 $^+$ /IFN- γ^+ Tc17-Zellen nachweisen [30],[31], deren funktionelle Bedeutung noch nicht abschließend geklärt ist. Tc1-fördernde Zytokine wie IL-2, IL-12 oder IFN- γ hemmen STAT-1- und STAT-5-vermittelt die Tc17-Differenzierung [30],[31],[36], indem sie die Tc17-fördernde STAT-3-Bindung an IL-17-Promotoren inhibieren (s. 6.9 Die transkriptionelle Regulation der Tc17-Zellen). Ob es analog zu natürlich vorkommenden, naiven Th17-Zellen auch natürliche Tc17-Zellen gibt oder diese erst nach Antigen-Kontakt entstehen, ist nicht abschließend geklärt [37].

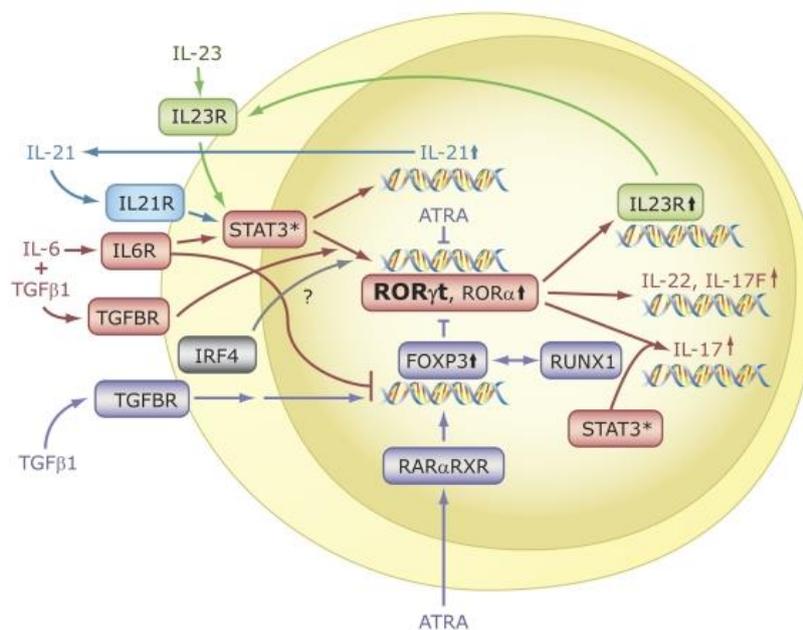


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Tc17-Differenzierung und beteiligter Faktoren

Modifiziert von Jetten et al., "Retinoid-Related Orphan Receptors (RORs): Critical Roles in Development, Immunity, Circadian Rhythm, and Cellular Metabolism" [38]. Der zentrale Tc17-Transkriptionsfaktor ROR γ t wird STAT-3- und IRF4-abhängig durch proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-23 und IL-21 sowie TGF- β induziert und aktiviert die Transkription von IL-17, IL-21, IL-22 und IL-23R. Ohne proinflammatorische Zytokine hemmt das durch TGF- β und Retinoide (ATRA; engl. all-trans retinoic acids) induzierte Foxp3 die ROR γ t Expression. Runx1 kann die Tc17-inhibitorische Wirkung von Foxp3 verstärken, jedoch auch milieuhängig über andere (nicht dargestellte) Interaktionen ROR γ t-fördernd wirken.

6.7 Funktionen von Tc17-Zellen

Über die Funktionen von physiologisch vorkommenden Tc17-Zellen ist bisher nicht viel bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17-bildende CD8⁺ T-Zellen bei der Schleimhautimmunität des Respirationstraktes, z.B. bei der Abwehr von Influenza-A- und Pilz-Infektionen [39],[40] sowie des Gastrointestinaltraktes [29] beteiligt sind. In pathologischen Zusammenhängen konnten Tc17-Zellen bei diversen Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose [41],[42], in experimentellen Modellen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [43],[44] und der rheumatoiden Arthritis [45] nachgewiesen werden. Auch bei der Psoriasis spielen IL-17-bildende T-Zellen eine zentrale pathogenetische Rolle [46]. Seit 2015 ist Secukinumab, ein monoklonaler Antikörper gegen IL-17A, als Therapie der schweren Psoriasis [47] sowie der Ankylosierenden Spondylitis (Morbus Bechterew) zugelassen und wird in weiteren Behandlungsstudien von Autoimmunerkrankungen geprüft [48]. Auch bei Graft-versus-Host-Reaktionen nach Organ- und Stammzelltransplantationen spielen Tc17-Zellen eine bedeutende Rolle [49]. Tc17-Zellen wurden außerdem im Tumor-Mikromilieu detektiert [19],[50],[51]. Ihr Vorkommen wird u.a. durch das lokale Zusammenwirken von immunsuppressivem TGF- β , proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 [50],[52],[53] sowie Tryptophan-Metaboliten, die über den intrazellulären Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) die IL-17-Bildung in CD8⁺ T-Zellen induzieren [54], erklärt. Ihre Funktion wird kontrovers diskutiert, da sowohl tumor-fördernde [19],[52],[54],[55], als auch anti-tumoröse Effekte beschrieben wurden [56],[57]. Eine mögliche Erklärung sind die uneinheitlichen Versuchs- und Auswertungsbedingungen der Studien. In einer Metaanalyse, die den Zusammenhang diverser humaner Malignome mit IL-17-Konzentrationen bzw. der Anzahl nachweisbarer Th17-Zellen untersuchte, konnte gezeigt werden, dass erhöhte IL-17-Konzentrationen (im Patientenserum oder Tumorgewebe) mit einem signifikant reduzierten Gesamtüberleben assoziiert waren [58]. Hingegen waren erhöhte Vorkommen von Th17-Zellen, die als CD4⁺ IL-17⁺ Zellen definiert wurden, mit einer verbesserten Prognose vergesellschaftet [58]. Bei der Analyse wurde jedoch vernachlässigt, welche anderen Zytokine (insbesondere INF- γ oder TNF- α) von Th17-Zellen koproduziert wurden. In Anbetracht der mikromilieuabhängigen Transformationsfähigkeit (s. 6.8 Die Plastizität von Tc17-Zellen) zu einem Tc1-ähnlichen Zytokinprofil mit verminderter IL-17-Bildung, ist die Aussagekraft der Studie daher eingeschränkt. Wie Th17-/Tc17-Zellen mechanistisch ihre Effekte auf Zielzellen vermitteln, ist ebenfalls unvollständig verstanden. IL-17 kann neutrophile Granulozyten chemotaktisch anlocken und Entzündungsreaktionen fördern [39],[57], indem z.B. die Chemokin-Bildung epithelialer Zellen angeregt wird [57],[59]. Außerdem induziert IL-22 die Bildung antimikrobieller Peptide in Epithelien [59]. IL-26, ein von menschlichen Th17-Zellen gebildetes Zytokin, kann über Porenbildung extrazelluläre Bakterien abtöten und liefert somit Hinweise für einen direkten antimikrobiellen und proinflammatorischen Effekt von Th17-Zellen [60].

6.8 Die Plastizität von Tc17-Zellen

Eine bedeutende Eigenschaft der Tc17-Zellen ist ihre mikromilieuabhängige Plastizität. Ein Tc17-förderndes Mikromilieu ist nicht nur für die initiale Tc17-Differenzierung nötig, sondern auch für die Aufrechterhaltung des Tc17-Phänotyps. Mehrere Studien zeigen, dass Tc17-Zellen sowohl in-vitro als auch in-vivo instabil sind und zumindest teilweise ihren IL-17⁺-Phänotyp auf Kosten einer zunehmenden IFN- γ -Bildung verlieren können [31],[61],[62], auch wenn „endgradig“ differenzierte Tc17-Zellen möglicherweise stabiler sind [63]. Es ist ferner bekannt, dass IL-17-bildende T-Zellen nach erfolgter Konversion eine erhöhte Funktionalität aufweisen, die IFN- γ -abhängig ist [31],[56],[64],[65]. So konnte z.B. in einem murinen Diabetes-Modell gezeigt werden, dass transferierte Th17-Zellen IFN- γ -abhängig Diabetes auslösten. Die Krankheitsmanifestation konnte dabei durch die Gabe von anti-IFN- γ , nicht jedoch durch anti-IL-17 verhindert werden [62]. Hierbei ist noch nicht abschließend geklärt, welche der entstehenden Tc17-Subpopulationen (IL-17⁺, IFN- γ ⁺, IL-17⁺/IFN- γ ⁺) am effizientesten wirken [31],[66]. Neben der Funktionalität ist auch bei der Entstehung von IFN- γ /IL-17-Doppelproduzenten weitestgehend ungeklärt, ob es sich um eine temporäre Übergangsform zwischen Tc17- und Tc1-Zellen handelt oder ob sie aus IL-17⁺/IFN- γ ⁺ T-Zellen entstehen [67]. Trotz Konversion in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp werden einige spezielle Tc17-Eigenschaften beibehalten, wie z.B. erhöhte Überlebens- und Persistenzraten in-vivo [31],[56]. Hierdurch unterscheiden sich diese transformierten Tc17-Zellen klar von primären Tc1-Zellen. Mögliche therapeutische Konsequenzen dieser Plastizität wurden bereits für adaptive Immuntherapien erforscht [56],[65]: In-vitro differenzierte, nicht-zytotoxische Tc17-Zellen bewirkten nach Transfer in tumortragende Mäuse eine signifikante Tumorrogression, nachdem sie sich in IFN- γ ⁺ bzw. IFN- γ ⁺/IL-17⁺-produzierende Zellen wandelten und gegenüber primären Tc1-Zellen eine signifikant höhere Persistenz aufwiesen [56].

Wie die Tc17-Stabilität bzw. -Plastizität reguliert wird und welche Faktoren dafür verantwortlich sind, ist gegenwärtig nicht komplett verstanden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Plastizität der Tc17-Zellen durch den Differenzierungsgrad [63] und die Suszeptibilität gegenüber dem vorherrschenden Mikromilieu (wie z.B. Zytokinen) bedingt ist. So wurden IL-17-supprimierende Effekte von IFN- γ [32]–[34],[68], IL-12, IL-18 und IL-2 beschrieben [64],[66],[69]. Auch IL-27 scheint die Plastizität zu fördern [63]. IL-23 stabilisiert hingegen den Tc17-Phänotyp [8],[42] und kann IL-12-vermittelten Signalen entgegenwirken [70]. Der IL-23R ist dementsprechend in IL-17-bildenden T-Zellen stark hochreguliert. Auch IL-21 ist in der Lage, über eine STAT-1- und STAT-4-unabhängige Suppression von Eomes die IFN- γ -Bildung zu hemmen [71] und die IL-17-Bildung IRF-4-abhängig zu fördern [72]. IL-1 ist außerdem in der Lage, der IL-2-vermittelten Inhibition des Tc17-Programms (durch Suppression von ROR γ t, IL-23R und IL-1R) entgegenzuwirken, indem IL-1 zu einer verstärkten Transkription der Tc17-Gene führt [36].

6.9 Die transkriptionelle Regulation der Tc17-Zellen

T-Zell-Differenzierungsprogramme beeinflussen sich nicht nur extrazellulär durch ihre charakteristischen Zytokine, sondern auch durch Interaktionen ihrer Transkriptionsfaktoren. Die zentralen Transkriptionsfaktoren der Th17/Tc17-Zellen sind ROR γ t und ROR α (kodiert durch die Gene RORc/a), die STAT-3-abhängig exprimiert werden und die Transkription von Tc17-Zielgenen wie IL-17a/f und IL-23R steigern [30] (Abb. 3). Auch der Transkriptionsfaktor IRF-4 ist von zentraler Bedeutung und fördert die Tc17-Differenzierung [32],[72]. T-Bet und Eomes sind hingegen die beiden zentralen Transkriptionsfaktoren des Tc1-Programmes [73],[74]. T-Bet wird nach TZR-Stimulation zügig hochreguliert und ist für die frühe Phase der Tc1-Differenzierung von Bedeutung, während Eomes spätere Funktionen von T-Bet übernehmen kann [75]. Dabei ist Eomes in der Lage, eine T-Bet-Defizienz teilweise zu kompensieren und die IFN- γ -Produktion in T-Bet-defizienten Th1-Zellen zu übernehmen [76]. Unter Th17-Bedingungen werden diese Zellen jedoch anfälliger für eine ROR γ t- bzw. IL-17-Induktion [76]. Dementsprechend sind T-Bet-defiziente Tc17-Zellen in ihrem Phänotyp stabiler, bilden mehr IL-17 und weniger IFN- γ [77]. Ein Grund könnte die erhöhte Expression des IL-23R sein [78]. Interessanterweise nehmen Tc1-Zellen, denen sowohl T-Bet, als auch Eomes fehlen, intrinsisch - d.h. ohne weitere Polarisierung - Tc17-Eigenschaften an, wie eine erhöhte IL-17- und ROR γ t-Expression [73]. Dies ist mit einer reduzierten Bildung von IFN- γ , Perforin und Granzyme B assoziiert, in deren Folge die CD8⁺ T-Zellen keine effektive antivirale Immunität mehr aufweisen [73]. Dies verdeutlicht, dass ein dominantes Tc1-Programm die Tc17-Differenzierung unter normalen Stimulationsbedingungen unterdrückt. Während T-Bet und Eomes in der Lage sind, ROR γ t zu supprimieren [73], kann ROR γ t lediglich Tc1-Effektorfunktionen unterdrücken, nicht jedoch die Expression von T-Bet/Eomes [79]. Hierzu ist zusätzlich eine Aktivierung des STAT-3-Systems nötig, welches die Eomes-Expression sowie weitere zentrale Tc1-Faktoren wie IFN- γ und Granzyme B unterdrücken kann. Diese asymmetrische Inhibierung könnte eine bedeutende Rolle für die Instabilität des Tc17-Phänotyps spielen, da die STAT-3-vermittelte Tc17-Stabilisierung bzw. Tc1-Inhibierung von einer Aufrechterhaltung eines Tc17-fördernden Zytokinmilieus abhängig ist [79]. Tc17 bzw. Th17-Zellen, die eine Koexpression von RORc und T-Bet aufweisen und IL-17⁺/IFN- γ ⁺ bilden [31],[35], könnten dementsprechend ein Beispiel für einen milieuhängigen, dynamischen Übergang in ein Tc1-ähnlichen Zustand darstellen. Wie genau und insbesondere durch welche Faktoren diese Plastizität gesteuert wird, ist bisher nicht umfassend geklärt.

6.10 An der Tc17-Differenzierung beteiligte Kofaktoren

Die Promotoren Tc17-relevanter Gene wie IL-17 verfügen über Bindestellen für ROR γ t, STAT-, Foxp- und Runx-Proteine [80],[81], so dass stets mehrere Kofaktoren an der Tc17-Differenzierung beteiligt

sind. Viele dieser Transkriptionsfaktoren können miteinander interagieren und so unterschiedliche Funktionen erfüllen. So kann Runx-1 einerseits auf die Th17/Tc17-Differenzierung hemmend wirken, indem es an Foxp3 bindet und die negative Wirkung von Foxp3 auf die Th17-Differenzierung verstärkt [80]. Andererseits kann Runx-1 auch IL-17-fördernd wirken, indem ROR γ t induziert und der IL-17-Promotor gebunden wird [80]. Dieser Mechanismus wird unter Th1-Bedingungen durch Interaktionen von T-Bet und Runx-1 blockiert [82]. Im Gegensatz dazu wird Runx-3 durch T-Bet induziert und fördert die Eomes-Synthese im Sinne einer positiven Rückkopplung, die eine Tc1-Differenzierung verstärkt [83]. Auch die SOCS-Proteine, die STATs dephosphorylieren und dadurch hemmend in die Zytokin-induzierte JAK/STAT-Signaltransduktion eingreifen, spielen bei der T-Zell-Differenzierung eine entscheidende Rolle. SOCS3 ist ein Negativregulator des Tc17-Programmes, indem es die IL-6-, IL-21- und IL-23-vermittelte STAT-3-Phosphorylierung hemmt [84]–[86], während SOCS1 v.a. die STAT-1-Phosphorylierung inhibiert [87] und so die Tc1-Differenzierung hemmt. Dementsprechend sind SOCS-Proteine auch bei der Plastizität von Tc17- zu Tc1-Zellen beteiligt [66]. Auch das Verhältnis der sich entgegengerichteten STAT-3- (aktiviert ROR γ t-/IL-17-Transkription) und STAT-1/STAT-5-Moleküle (hemmt IL-17-Transkription) ist entscheidend für die IL-17-Bildung [66].

6.11 CTLA-4 (CD152)

CTLA-4 (engl.: cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) ist ein transmembranes Glykoprotein, das strukturell homolog zu CD28 ist und ebenfalls zur Ig-Familie der Ko-Rezeptoren gehört. Während CD28 konstitutiv auf T-Zellen exprimiert wird, lässt sich CTLA-4 erst nach Aktivierung auf der Oberfläche von T-Zellen nachweisen und akkumuliert verstärkt in der immunologischen Synapse [88]. Mit zunehmender Dauer nach T-Zellaktivierung wird membranständiges CTLA-4 internalisiert [88]. CTLA-4 und CD28 binden während der Kostimulation die gleichen B7-Liganden CD80/CD86 auf APZ. Während CD28 auf die T-Zellaktivierung fördernd wirkt, hemmt CTLA-4 diese (Abb. 1). Der immuninhibitorische Einfluss von CTLA-4 wird in CTLA-4^{-/-} Mäusen deutlich, die im Alter von wenigen Wochen an einer lymphoproliferativen Erkrankung zugrunde gehen, die durch unkontrolliert hyperaktivierte und proliferierende CD4⁺ T-Zellen charakterisiert ist [89]. CD8⁺ T-Zellen behalten hingegen in CTLA-4^{-/-} Mäusen einen weitestgehend naiven Phänotyp und sind pathogenetisch nicht an der lymphoproliferativen Erkrankung beteiligt [90]. Interessanterweise exprimieren CD8⁺ T-Zellen stärker CTLA-4 auf ihrer Oberfläche als CD4⁺ T-Zellen [91], was auf eine besondere Bedeutung von CTLA-4 für CD8⁺ T-Zellen hinweisen könnte.

6.12 Einfluss von CTLA-4 auf die T-Zell-Aktivierung

CTLA-4 ist über diverse zellintrinsic und -extrinsic Mechanismen in der Lage, die Kostimulation und Aktivierung von T-Zellen zu inhibieren. So können durch CTLA-4 die B7-Liganden mit einer vielfach höheren Affinität gebunden und CD28 kompetitiv verdrängt [92], die CD28-Dichte in der immunologischen Synapse [93] sowie der Zellmembran [94] reduziert, Kontaktzeiten zwischen T-Zellen und APZ verkürzt [95] oder Lipid-Rafts-Formationen beeinträchtigt [92] werden. Die T-Zell-Aktivierung kann über Bindung verschiedener Phosphatasen (SHP-2) an sog. ITIM-Motive (engl.: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) in der zytoplasmatischen Domäne von CTLA-4 [96] oder eine gestörte nukleäre NFAT-Translokation gehemmt werden [97],[98]. Über zellextrinsische Mechanismen ist CTLA-4 auf CD4⁺ T-Zellen außerdem in der Lage, CD86-Moleküle auf APZ verstärkt internalisieren und degradieren zu lassen [99] und so indirekt die CD28-vermittelte Kostimulation zu hemmen. Außerdem induziert CTLA-4 die Freisetzung des Tryptan-abbauenden Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) aus APZ, das inhibitorisch auf T-Zellen wirkt [92].

6.13 Einfluss von CTLA-4 auf die T-Zell-Differenzierung

In Tc1-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass CTLA-4 selektiv durch eine Unterdrückung des Transkriptionsfaktors Eomes die Tc1-Differenzierung inhibiert [91],[100],[101]. CTLA-4^{-/-} Tc1-Zellen demonstrieren eine erhöhte IFN- γ - und Granzyme B-Bildung, die mit einer erhöhten Zytotoxizität in vivo assoziiert ist [100]. T-Bet wird unter Tc1-Bedingungen nicht von CTLA-4-Signalen beeinflusst [100],[101]. Weitere Daten belegen außerdem, dass CTLA-4 auf Translationsebene über die Induktion von PDCD4 (engl.: programmed cell death protein 4) die Translation von Tc1-relevanten Proteinen hemmen kann [102]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass CTLA-4 die Differenzierung und Funktion von Tc1-Zellen spezifisch steuert, war die Bedeutung für Tc17-Zellen unklar. Insbesondere da sich die Tc1- und Tc17-Programme regulatorisch gegenseitig hemmen [73], sollte im Folgenden die Bedeutung von CTLA-4 für die Differenzierung und Stabilität von Tc17-Zellen untersucht werden. Die Erkenntnisse könnten das Wissen über die CTLA-4-vermittelte T-Zell-Immunität erweitern und so die klinischen Ergebnisse immunmodulierender Therapien (wie anti-CTLA-4) optimieren.

6.14 Die medizinische Bedeutung von CTLA-4

6.14.1 Anti-CTLA-4 in der Tumorthherapie

Immunsuppressive Mechanismen, wie durch CTLA-4 vermittelt, können von Tumorzellen manipuliert werden, um im Zuge der Immunevasion eine Ihnen entgegengerichtete Immunantwort zu schwächen. Das Wirkprinzip CTLA-4s lässt sich jedoch therapeutisch nutzen: Die Arbeitsgruppe von James Allison konnte 1996 erstmalig experimentell demonstrieren, dass blockierende Antikörper

gegen CTLA-4 zu einer gesteigerten Anti-Tumor-Immunität in der Maus führten [103]. Mit Ipilimumab, einem humanisierten monoklonalen CTLA-4-blockierenden Antikörper des IgG1 Isotyps, wird dieses therapeutische Prinzip heutzutage bei Patienten mit inoperablen, metastasierten malignen Melanomen erfolgreich genutzt. Ipilimumab konnte in dieser Patientengruppe eine signifikante Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens von ca. 6 auf 10 Monate bewirken und zeigte bei bis zu 20% der Patienten vollständige Tumorregressionen über mindestens 4 Jahre [104]–[107]. Ipilimumab ist in Kombination mit Nivolumab (s. 6.14.2 Kombinationstherapien) für die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms [108] sowie des kolorektalen Karzinoms mit Mikrosatelliteninstabilität bzw. Mismatch-Repair-Defizienz [109] zugelassen. Weitere Therapie-Indikationen, wie z.B. das fortgeschrittene Lungenkarzinom [110], werden in Studien geprüft. James Allison erhielt für seine bahnbrechende Forschung zu anti-CTLA-4 den Medizin-Nobelpreis 2018 (zusammen mit Tasuku Honjo für seine Arbeiten zu PD-1/anti-PD-1).

Trotz der bisherigen therapeutischen Erfolge stehen weiterhin zwei große Probleme im Raum: Zum einen profitiert bisher nur ein kleiner Anteil der Melanom-Patienten von der anti-CTLA-4-Therapie. Zum anderen treten bei bis zu 45% der Patienten schwere Nebenwirkungen im Sinne autoimmuner Entzündungsreaktionen auf, die v.a. die Haut und Schleimhäute betreffen und nicht mit dem Therapieerfolg korrelieren [104],[111]. Die zugrundeliegenden Wirkmechanismen sind gegenwärtig noch nicht vollständig verstanden. Um die therapeutischen Effekte zu optimieren und Nebenwirkungen zu reduzieren, sind weitere Erkenntnisse über die komplexen Einflüsse CTLA-4s auf die T-Zell-Immunität nötig. Bisherige Daten deuten auf eine gesteigerte Funktionalität der T-Zellen durch eine Ipilimumab-vermittelte Desinhibition hin [112]–[115]. Anti-CTLA-4 wirkt wahrscheinlich vor allem auf CD8⁺ T-Zellen, da der therapeutische Effekt in CD4⁺ T-Zell-depletierten und B-Zell-defizienten Mäusen ebenfalls bestand hatte [116]. Nach anti-CTLA-4-Gabe konnten dementsprechend erhöhte Anzahlen an tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden [112]–[114],[116]. Diese Zellen zeigen außerdem qualitative Veränderungen, wie hochregulierte Aktivitätsmarker [117], gesteigerte IFN- γ - und Granzyme B-Expression sowie eine effizientere Tumorzell-Lyse in-vitro [113],[118],[119]. Durch die Kombination therapeutischer Impfstoffe gegen spezifische Melanom-Antigene (wie NY-ESO-1 oder pg100) mit einer als „Booster“ verabreichten Dosis anti-CTLA-4 konnte ebenfalls eine gesteigerte antigenspezifische Immunantwort von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induziert werden, die durch eine Koexpression polyfunktionaler Zytokine wie IFN- γ und TNF- α charakterisiert war [120]. Durch Neutralisierung von IFN- γ konnte in anderen Experimenten der durch Ipilimumab vermittelte Anti-Tumor-Effekt komplett aufgehoben werden [121], so dass neben TNF- α vor allem IFN- γ als Tc1-Zytokin eine zentrale Bedeutung für die Tumorregression zukommt [122],[123].

6.14.2 Kombinationstherapien

Da Tumorzellen mehrere immunsuppressive Mechanismen manipulieren oder kompensatorisch hochregulieren können, ist oftmals eine einzige therapeutische Intervention (wie eine CTLA-4-Blockade) nicht ausreichend, um die Immunevasion zu überwinden [124]. Daher werden blockierende Antikörper gegen verschiedene immunregulatorische Moleküle (sog. Immuncheckpoint-Inhibitoren) kombiniert. Neben CTLA-4 ist vor allem der auf aktivierten T-Zellen exprimierte Korezeptor PD-1 (engl.: programmed cell death protein 1) von Bedeutung, der ebenfalls T-Zell-Effektorfunktionen hemmt. Durch die gesteigerte Expression von PD-1-Liganden (PD-L1) auf Tumorzellen kann Apoptose und Anergie in T-Effektorzellen ausgelöst sowie die Bildung von Treg induziert werden [125],[126]. Heutzutage stehen mehrere therapeutische monoklonale Antikörper gegen PD-1 (wie Nivolumab und Pembrolizumab) sowie gegen PD-L1 (wie Atezolizumab und Durvalumab) zur Verfügung. Im Vergleich zur Monotherapie mit anti-CTLA-4 ließ sich die 3-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit metastasiertem Melanom durch den zusätzlichen Einsatz von anti-PD-1 von 34% auf ca. 60% signifikant verbessern [127],[128].

Weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren, wie gegen das T-Zell-inhibitorische Molekül VISTA (engl.: V domain-containing Ig suppressor of T-cell activation), werden im Rahmen von Studien geprüft. VISTA wird nach anti-CTLA-4-Behandlung kompensatorisch auf T-Zellen hochreguliert und inhibiert die TNF- α /IFN- γ -Bildung [129]. Dieser Mechanismus könnte dazu beitragen, dass nicht alle Patienten von einer Therapie mit anti-CTLA-4/anti-PD-1 profitieren [129], da VISTA über einen distinkten, nicht-redundanten Signalweg T-Zell-Funktionen hemmt [130].

Die genauen mechanistischen Einflüsse der Immuncheckpoint-Blockade auf die qualitative Differenzierung der tumorinfiltrierenden T-Zellen und ihre Zytokinproduktion sind bisher nicht umfassend verstanden. Insbesondere der Einfluss auf Tc17-Zellen, die regelmäßig im Tumormikromilieu nachweisbar sind [56],[57],[65], bleibt in diesem Zusammenhang bisher unklar. Neben der Beeinflussung der T-Zell-Differenzierung gibt es auch Hinweise dafür, dass die Aufhebung der T-Zell-Erschöpfung im Tumormikromilieu eine bedeutende Rolle für den Therapieerfolg der Immuncheckpoint-Inhibitoren spielt. Patienten, deren tumorinfiltrierende CD8⁺ T-Zellen eine erhöhte Expression von CTLA-4 und PD-1 aufwiesen (ein Phänotyp, der häufig bei erschöpften T-Zellen nachgewiesen werden konnte [131],[132]), sprachen besser auf eine Therapie mit anti-CTLA-4/anti-PD-1 an [133]. Andere Studien demonstrierten ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression von Tumorzellen und der Ansprechrate auf anti-PD-1 [134]. Die PD-L1-Expression wird daher als prädiktiver Marker für ein Therapieansprechen auf anti-PD-1 beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) genutzt [135].

Die Wirksamkeit der immunbasierten Therapie bei unterschiedlichen Tumorentitäten wie dem malignen Melanom, NSCLC oder dem Nierenzellkarzinom deutet auf einen Zusammenhang zwischen der genetischen Heterogenität bzw. „Immunogenität“ der Tumorantigene und dem Therapieansprechen hin. Vor allem Tumore mit vielen immunogenen Epitopen bzw. Neo-Antigenen, wie maligne Melanome oder NSCLC, sprechen verstärkt auf T-Zell-vermittelte Immunantworten an [136]. Nach CTLA-4-/PD-1-Blockade zeigten diese Tumorentitäten erhöhte Anzahlen tumorinfiltrierender CD8⁺ T-Zellen auf und waren mit einem erhöhten Gesamtüberleben assoziiert [133], während Patienten mit nur schwach immunogenen Tumoren posttherapeutisch eine verminderte T-Zell-Infiltration sowie ein reduziertes Gesamtüberleben zeigten [133]. Es wird geprüft, ob neben dem Einsatz von anti-PD-1/anti-CTLA-4 auch die zusätzliche Gabe von gegen Tumorantigene gerichtete Antikörper (die eine verstärkte Tumorantigen-Aufnahme und -Präsentation durch APZ vermitteln) oder zusätzliche Impfungen mit Tumor-Antigenen einen positiven Effekt haben können [124],[137]. Auch die Kombinationstherapie mit konventioneller Radio-/Chemotherapie kann zu einer Potenzierung des immunbasierten Therapieerfolges führen, da immunogene Antigene verstärkt freigesetzt werden [138].

6.14.3 CTLA-4-Ig in der Therapie autoimmuner Erkrankungen

CTLA-4 wird ebenfalls in der Therapie von Autoimmunerkrankungen gezielt genutzt. Abatacept, ein Fusionsprotein aus dem Fc-Teil eines IgG1-Immunglobulins sowie der extrazellulären Domäne CTLA-4s, bindet mechanistisch CD80/86 auf APZ und verhindert so die CD28-vermittelte Kostimulation der T-Zellen [139]. Im Gegensatz zur CTLA-4-Blockade wird durch Abatacept ein immunsuppressiver Effekt erzeugt, der bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen therapeutisch ausgenutzt werden kann. Bei Rheumatoider Arthritis wird Abatacept bei besonders schweren Verläufen oder nach Versagen der Standardtherapie verwendet [140] und bewirkte in über 60% der Patienten eine klinische Remission [141]. Auch zur Therapie der Psoriasis-Arthritis ist Abatacept nach Versagen der Standardtherapie zugelassen [142].

Der Einsatz von Abatacept gegen weitere Autoimmunerkrankungen wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [143] oder Diabetes mellitus Typ 1 [144] wurde in Studien geprüft. Hierbei konnte jedoch bisher keine signifikante Wirksamkeit belegt werden. Dies verdeutlicht, dass zahlreiche, durch eine iatrogene Manipulation der CTLA-4/CD28-Achse vermittelte Effekte in T-Zellen noch unzureichend erforscht sind, jedoch für das klinische Ergebnis entscheidend sein können.

7 Material, Versuchstiere und Methoden

Sämtliche Arbeiten mit den aufgeführten Geräten und Materialien wurden (wenn nicht anders erwähnt) im Institut für Experimentelle Pädiatrie, Universitätskinderklinik Magdeburg, im Zeitraum von 10/2008 - 04/2016 durchgeführt.

7.1 Materialien und Versuchstiere

7.1.1 Geräte

AutoMACS pro	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Blockthermostat, BT-100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
FACS Analyser Canto II	BD Biosciences, San Jose, USA
Inkubator, CB 210	Binder, Tuttlingen
Mikroskop, CKX 41	Olympus, Hamburg
NanoPhotometer	Implen, München
Pipetten, Pipetboy	Gilson Inc, Middleton, USA
Pipetten, Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Real-Time System, CFX96	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Software (für Windows):	
FACS Diva	BD Biosciences, San Jose, USA
FlowJo 7	Tristar Inc, Oregon, USA
Bio-Rad CFX Manager	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc, La Jolla, USA
CorelDraw X6	Corel Corporation, Ottawa, Kanda
Spannungsquelle, Powerpack 25	Biometra, Göttingen
Sterilwerkbank, HERASafe KS	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermocycler, C1000	Bio-Rad Laboratories, München
Tiefkühler:	
-80°C, HERAFreeze	Thermo Scientific, Waltham, USA
-20°C, Mediline	Liebherr, Schweiz
Waagen	Kern & Sohn, Balingen
Wasserbad (beheizbar), M 12	Lauda, Lauda-Königshofen
PC, Betriebssystem Windows XP	Microsoft, Redmond, USA
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifugen Biofuge fresco, Multifuge 3SR ⁺	Heraeus Instruments, Hanau

7.1.2 Kunststoff- und Zellkulturartikel

Alle angegebenen Artikel stammen von den Firmen Braun (Melsungen), Costar (Bodenheim), Dynatech laboratories (El Paso, USA), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickhausen), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) sowie BD Bioscience (San Jose, USA). Petrischalen in verschiedenen Größen, PP-Röhrchen in den Größen 15 ml und 50 ml, Reaktionsgefäße in den Größen 0,2 ml (für RT-PCR), 0,5 ml und 1,5 ml, Spritzen und Aufsteckspitzen (Pipettenspitzen, Filterspitzen) in verschiedenen Größen, Zellfilter (0,2 µm) und Zellsiebe (70 µm), Zellkulturplatten mit 12, 24 oder 48 Reaktionsvertiefungen.

7.1.3 Puffer, Zellkulturmedien

Für das Ansetzen von Lösungen wurde Wasser mit Milipore (Schwalbach) membranfiltriert. Alle aufgeführten Chemikalien wurden (falls nicht anderes angegeben) von Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. AutoMACS Running Buffer wurde von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) bezogen.

Erythrozyten-Lyse-Puffer:	10 mM KHCO ₃ + 155 mM NH ₄ Cl + 0,1 mM EDTA (pH 7,5)
Fixierungslösung:	2 % Paraformaldehyd in PBS (PFA)
PBS:	137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 1,5 mM KH ₂ PO ₄ + 8,1 mM Na ₂ HPO ₄
PBS/BSA:	PBS + 2 g/l (0,2%) BSA (engl.: Bovine serum albumin)
PBS/BSA/Azid:	PBS/BSA + 0,05 % NaN ₃
Permeabilisierungspuffer:	0,5 % Saponin in PBS/BSA
Zellkulturmedium:	RPMI 1640 (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) + 10 % fetales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert (Sigma Aldrich, Steinheim) + Glutamax-I (0,3 mg/ml Glutamin) + 10 µg/ml 2-Mercaptoethanol + 10 nM Natriumpyruvat (Biochrom, Berlin) + Antibiotika-Zusatz (100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin (PAA, Pasching, Österreich))

7.1.4 Antikörper, Zytokine, Chemikalien

Mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper für FACS-Färbungen: anti-TCR Vα2 (B20.1), anti-CD4 (11B11), anti-CD8α (53-6.7), anti-CD45.2 (104), anti-IFN-γ (XMG1.2), anti-IL-17 (Tc11-18H10), anti-TNFα (MP6-XT22), anti-IL-2 (JES6-1A12), anti-IL-4 (11B11), anti-IL-10 (JES5-16E3), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD127 (SB/199) wurden von BD Biosciences (San Jose, USA) bezogen. Anti-RORγt (AFKJS-9), anti-FoxP3 (FJK-16S9), anti-CTLA-4 (UC10-4B9) wurden von eBioscience (San Diego, USA) bezogen. Anti-T-bet (4BIO), anti-FasL (MLF4) wurden von Biolegend (San Diego, USA), anti-GranzymeB-PE (GB12) von Caltag Laboratories (Burlingame, USA) bezogen. Anti-CD44 (IM7), anti-CD62L (MEL14), anti-CTLA-4 (UC10-4F10-11) wurden vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) bereitgestellt. Anti-Streptavidin- sowie Isotyp-Kontroll-Antikörper wie anti-murine-IgG1, anti-

rat-IgG1, anti-rat-IgG2a, anti-rat-IgG2b und anti-armenian hamster IgG wurden von BD Biosciences (San Jose, USA), Caltag Laboratories (Burlingame, USA) und eBioscience (San Diego, USA) bezogen.

Neutralisierende Antikörper in Tc17-Zellkulturen: Anti-IL-2 (JES6-1A12) und anti-IL-4 (11B11) wurden vom DRFZ bereitgestellt, anti-IFN- γ (XMG1.2) von BD Bioscience (San Jose, USA) erworben.

Zytokine: Rekombinantes TGF- β 1 (human), IL-6 (Maus) und IL-23 (Maus) wurden von R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.

Ovalbumin-Peptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄) wurde von P. Henklein, Biochemisches Institut der Charité (Berlin), bereitgestellt.

PI und Annexin-V wurden aus dem FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit II von BD Bioscience (San Jose, USA) nach Herstellerprotokoll genutzt. Annexin bindet an Phosphatidylserine auf der extrazellulären Zellmembranseite apoptotischer Zellen, während PI in spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen eindringt. Das an Annexin-gekoppelte FITC und PI werden durchflusszytometrisch detektiert. PI⁻ und Annexin-V⁻ Zellen wurden als nicht-apoptotisch gewertet.

7.1.5 Versuchstiere/Mäuse

Die Versuche wurden übereinstimmend mit staatlichen und institutionellen Richtlinien durchgeführt (Tierversuchsgenehmigungen 42502-2-848, 42502-2-1020 Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt). Für die Experimente wurden Mäuse mit gleichem Geschlecht und ähnlichem Alter (5 – 8 Wochen) verwendet. Alle Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg gehalten.

- Ly5.1-Mäuse: Stamm C57Bl/6, CD45.1 positiv.
- CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} OT.1-Mäuse: Stamm C57Bl/6, CD45.2 positiv, CD45.1 negativ.
- CTLA-4^{-/-} OT.1-Mäuse wurden durch Kreuzungen aus den Ursprungsstämmen gezüchtet und die Nachkommen per PCR genotypisiert [234].

Erläuterung OT.1: CD8⁺ T-Lymphozyten der OT.1-Mäuse tragen ein Transgen, das für die variablen Regionen der α - und β -Ketten des TZR kodiert (V α 2-J α 26 und V β 5-D β 2-J β 6) und exprimieren durch allele Exklusion einen transgenen TZR (TZR^{tg}), der ausschließlich ein aus acht Aminosäuren bestehendes Peptid des Ovalbumins (SIINFEKL-Peptid; OVA₂₅₇₋₂₆₄) in MHC-I-Molekülen erkennt und daher eine antigenspezifische Aktivierung erlaubt. Die TZR^{tg}-Expression wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.

7.2 Methoden

7.2.1 Zellgewinnung und -Sortierung

Für die Gewinnung der CD8⁺ T-Zellen wurden Milzen und periphere Lymphknoten (axillär, brachial, inguinal) von CTLA4^{+/+} bzw. CTLA4^{-/-} OT.1 Mäusen entnommen, nachdem diese durch zervikale Dislokation tierschutzgerecht getötet worden waren. Die Organe wurden homogenisiert und mit Erythrozyten-Lyse-Puffer (4 min auf Eis) behandelt. Aus der Zellsuspension wurden naive OT.1 CD62L⁺ CD8⁺ T-Zellen per magnetischer Zellseparation (MACS; engl.: magnetic cell separation) mit einem AutoMACS pro und dem Multi-Sort Kit (beides Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) entsprechend der Hersteller-Protokolle zu > 98% angereichert. Routinemäßig wurde die Expression von aktivierungsinduzierten Molekülen wie CD44, CD69 und CD127 durchflusszytometrisch kontrolliert (Abb. 7). Als APZ wurden T-Zell-depletierte Splenozyten aus der CD90⁻ Zellfraktion von Ly5.1-Mäusen genutzt. Hierfür erfolgte im AutoMACS pro mit Hilfe magnetischer CD90-Microbeads entsprechend der Hersteller-Protokolle die Zellauftrennung mit einer Reinheit von > 98 % CD90⁻ Zellen (Abb. 4).

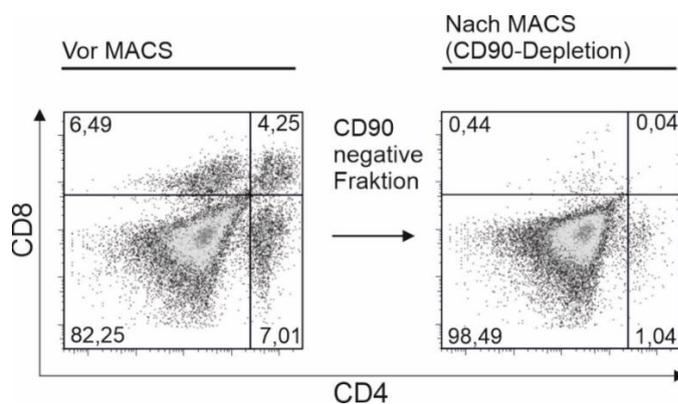


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Kontrolle der CD90⁻-Anreicherung per MACS

Die Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ Splenozyten der Ly5.1-Mäuse wurden vor und nach einer CD90-Depletion („T-Zellen-Depletion“) per MACS durchflusszytometrisch kontrolliert (Zahlen in % der totalen Splenozyten innerhalb des Lymphozytengates, das anhand des Forward- und Sideward-Scatters eingestellt wurde). Gezeigt ist eine repräsentative CD90⁻-Depletion von insgesamt 26 unabhängigen Versuchen.

7.2.2 Zellkulturen

Zur antigenspezifischen Aktivierung wurden CD62L^{high} CD8⁺ OT.1-Zellen im Verhältnis 1:4 mit kongenen APZ bei einer Gesamtzellkonzentration von 2×10^6 /ml in das Zellkultur-Medium gegeben und durch Zugabe von 1 µg/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ aktiviert. Bei Tc17-Kulturen wurden zusätzlich IL-6 (20 ng/ml), TGF-β (1 ng/ml), IL-23 (10 ng/ml), anti-IL-4 (10 µg/ml), anti-IL-2 (10 µg/ml) und anti-IFN-γ (10 µg/ml) hinzugefügt. Für Tc1-Kulturen wurden keine zusätzlichen Zytokine bzw. Antikörper in das Medium gegeben. Anschließend wurden die Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C

kultiviert. An Tag drei nach Primärstimulation erfolgte ein Mediumwechsel ohne Zytokinzusatz. Für Sekundärstimulationen wurden an Tag fünf tote Zellen durch Gradientenzentrifugation (Histopaque-1083, Sigma Aldrich, Steinheim) abgetrennt und lebende CD8⁺ T-Zellen mit frischem OVA₂₅₇₋₂₆₄, APZ und Zellkulturmedium bei identischen Kulturbedingungen wie bei Primärstimulation antigenspezifisch restimuliert (ohne Zusatz von Zytokinen).

7.2.3 Durchflusszytometrie (FACS; engl.: fluorescence activated cell sorting)

Falls nicht anders angegeben, erfolgten durchflusszytometrische Analysen mit einem FACS-Canto II (BD Biosciences, San Jose, USA). FSC-/SSC-Signale wurden in linearer, Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung registriert und mit FlowJo 7 (Tree Star, Oregon, USA) analysiert. Für RT-PCR-Experimente wurden CD45.2⁺ CD8⁺ T-Zellen (verwendete Antikörper s. 7.1.4 Antikörper) durch Herrn Dr. Roland Hartig (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universität Magdeburg) aus Zellkulturen per FACS Diva Sorter (BD Biosciences, San Jose, USA) zu > 99% angereichert.

7.2.4 Zellfärbungen für die Durchflusszytometrie

Färbungen der Zelloberfläche: Zellen wurden von den Zellkulturplatten geerntet und mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (verwendete Antikörper s. 7.1.4 Antikörper) in PBS/BSA (auf Eis; 10 min im Dunklen) inkubiert. Für Oberflächenfärbungen wurden 20.000 - 100.000 lebende Zellen aus den Zellkulturen durchflusszytometrisch gemessen.

Intrazelluläre Färbungen: Vor der Färbung wurden die Zellen in den Zellkulturplatten mit PMA (50 ng/ml), Ionomycin (500 ng/ml) und Brefeldin-A für 4 h restimuliert. Nach einer Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert (auf Eis, 20 min im Dunkeln), anschließend mit 0,5% Saponin in PBS/BSA perforiert und danach intrazellulär gefärbt (auf Eis, 15 min im Dunkeln). Abweichend davon erfolgten intranukleäre Färbungen von RORγt, T-bet und Foxp3 mit dem Foxp3-Staining-Kit (eBioscience, San Diego, USA) entsprechend der Hersteller-Protokolle (verwendete Antikörper s. 7.1.4 Antikörper). Bei intrazellulären Färbungen wurden ca. 1×10^5 Lymphozyten aufgezeichnet.

Median fluorescence intensity (MFI): Maß für die Zytokin-Expression pro Zelle. Die integrierte MFI (iMFI) ist das Produkt der MFI und der Häufigkeit Zytokin-produzierender Zellen und erlaubt daher eine Abschätzung der funktionellen Qualität der entsprechenden Zellen [145].

Zell-Proliferation: Zur Messung der T-Zell-Proliferation wurden naive CD8⁺ T-Zellen (1×10^7 Zellen/ml) vor Ansatz der Zellkulturen (s. 7.2.2 Zellkulturen) mit 5 μM CFSE (5,6-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidyl-Ester; Molecular Probes, Eugene, USA) angefärbt (5 min auf Eis im Dunkeln, zweimaliges Waschen mit Zellkulturmedium). CFSE ist ein fluoreszierender Zellfarbstoff, der

zellmembranpermeabel ist und je Zellteilung in seiner Menge gleichmäßig abnimmt, was durchflusszytometrisch detektiert werden kann.

7.2.5 Ko-Kulturen

Für Ko-Kulturen (Abb. 5) wurden naive CTLA4^{+/+} OT.1 CD8⁺ CD62L^{high} T-Zellen mit CFSE (1:10.000, 5 min auf Eis) angefärbt. Danach wurden die CFSE-markierten CD8⁺ Zellen mit CFSE-unmarkierten, naiven CTLA4^{-/-} OT.1 CD8⁺ Zellen zu identischen Verhältnissen vermischt. Anschließend wurde die Ko-Kultur mit APZ, OVA₂₅₇₋₂₆₄ und Zytokinen unter Tc17-Bedingungen angesetzt. Anhand der CFSE-Markierung war es möglich, CTLA4^{+/+} von CTLA4^{-/-} Tc17-Zellen zu unterscheiden, obwohl diese in derselben Zellkultur unter identischen Tc17-Stimulationsbedingungen kultiviert wurden (Abb. 5). Die Ko-Kultur-Experimente wurden auch vice versa durchgeführt, d.h. dass in einem zweiten Versuchsansatz naive CTLA4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen mit CFSE markiert und diese mit unmarkierten, naiven CTLA4^{+/+} CD8⁺ Zellen in einer Ko-Kultur vereinigt wurden (ansonsten identischer Versuchsaufbau).

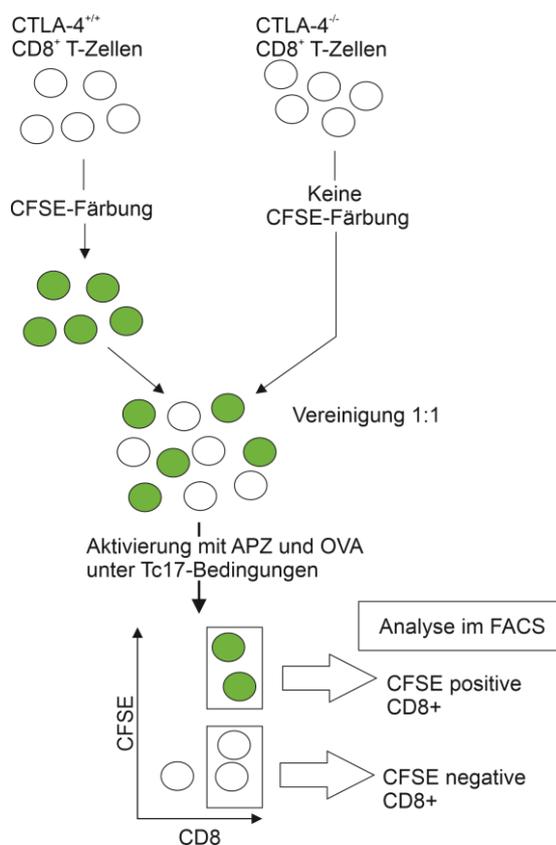


Abbildung 5: Illustration zum Ansetzen der Ko-Kulturen

CTLA4^{+/+} oder CTLA4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen wurden vor dem Versuch mit CFSE angefärbt (grün) und mit ungefärbten (transparent) CD8⁺ T-Zellen 1:1 vereinigt. Dieser T-Zell-Mix wurde mit APZ und OVA-I unter Tc17-Konditionen aktiviert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die T-Zellen per Durchflusszytometrie auf ihre Zytokinbildung analysiert. Dabei konnten CFSE⁺ und CFSE⁻ T-Zellen, die unter identischen Bedingungen stimuliert worden waren, getrennt analysiert und extrinsische Einflüsse minimiert werden (Abb. 11). Der Versuch wurde jeweils auch vice versa angesetzt.

7.2.6 Cytometric bead assay (CBA)

Tc17-Kulturüberstände wurden an verschiedenen Tagen nach Primärstimulation entnommen und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Zur Quantifizierung der Zytokin-Konzentrationen wurden CBA Flex Sets für IL-2, TNF- α und IL-17 (BD Bioscience, San Jose, USA) entsprechend der Herstellerprotokolle genutzt. Die Ergebnisse wurden mit der FCAP Array Software (BD Bioscience, San Jose, USA) ausgewertet.

7.2.7 Realtime-PCR

Gewinnung von mRNA und reverse Transkription: CD45.2⁺ CD8⁺ T-Zellen aus Tc1- und Tc17-Zellkulturansätzen wurden an definierten Zeitpunkten nach Primärstimulation per FACS-Sortierung (durch Herrn Dr. Roland Hartig, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universität Magdeburg) zu $\geq 98\%$ angereichert. Mit dem Nucleospin RNA/Protein Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren) wurden die RNA- und Protein-Fractionen aus den lysierten Zellen isoliert. RNA wurde per Reverse Transkriptase-PCR mit Hilfe von TaqMan Reagenzien (Applied Biosystems, Foster City, USA) in einem Biorad CFX96 RealTime System in cDNA umgeschrieben und zur Anlagerung der Hexamere für 10 min bei 25°C im C1000 Thermocycler inkubiert. Die cDNA Erststrang-Synthese erfolgte bei 42°C für 40 min. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 95°C für 5 min. cDNA wurde in allen Proben auf identische Konzentrationen eingestellt, photospektrometrisch kontrolliert, und bei -80°C gelagert.

Realtime-PCR und Primer: Die RT-PCR wurde in 20 μl Volumen mit dem Fermentas Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA) in einem Biorad CFX96 RealTime System durchgeführt. Oligonukleotid-Primer (Primer-Sequenzen s. 15 Anlagen) für die Realtime-PCR-Amplifikation wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

7.2.8 In-vivo Experimente (Listeria monocytogenes-Infektionsmodell)

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dirk Schlüter, Institut für Medizinische Mikrobiologie (insbesondere unter Mithilfe von Herrn Dr. Nishanth Gopala) wurde in einem murinen Infektionsmodell die Fähigkeit von in-vitro differenzierten CTLA4^{+/+} und CTLA4^{-/-} Tc17-Zellen verglichen, Infektionen mit *Listeria monocytogenes* (LM) zu bekämpfen (Abb. 6). Als Positivkontrolle dienen in-vitro differenzierte CTLA4^{+/+} OT.1 Tc1-Zellen, die eine effektive LM-Immunität vermitteln. Als Negativkontrolle wurde PBS intravenös (i.v.) injiziert. Identische Anzahlen (1×10^6) an OT.1 Tc1- bzw. Tc17-Zellen (PI⁻ und Annexin-V⁻) wurden an Tag drei nach Primärstimulation „bulk-cultured“ über eine Schwanzvene i.v. in die gleichgeschlechtlichen und gleichaltrigen Ly5.1-Empfängermäuse injiziert (durch Herrn Dr. Nishanth Gopala). 24 h später wurden die Ly5.1-Mäuse mit einem rekombinanten OVA-I-transgenen LM-Stamm zu identischen Dosen (1×10^5 CFU, engl.: colony forming unit) durch Herrn Dr. Nishanth Gopala i.v. infiziert. LM wurde zuvor auf Tryptose-Agar 1 h

kultiviert und densitometrisch auf 1×10^5 CFU mit sterilem, pyrogen-freiem PBS (pH 7,4) eingestellt. Nach der Infektion erfolgte eine Kontrolle der injizierten Dosis durch Aussaat auf Tryptose-Agar und Zählung der Kolonien nach 24 h bei 37 °C (durch Herrn Dr. Nishanth Gopala). 24 h nach Infektion wurden Milzen und Lebern entnommen und homogenisiert. Die absoluten Splenozyten-Zahlen wurden in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Milz- und Leberhomogenisate zur Bestimmung der LM-CFU in Verdünnungsreihen auf Tryptose-Agar-Platten geimpft (im Institut für Medizinische Mikrobiologie). Die Anzahl der CFU wurden mikroskopisch nach 24 h Inkubation bei 37°C durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie bestimmt. Ferner wurde aus den hepatischen und splenischen Homogenisaten nach entsprechender Aufarbeitung eine durchflusszytometrische Analyse der transferierten $CD45.2^+ CD8^+$ Zellen durchgeführt, die eindeutig von den $CD45.2^-$ Zellen der Ly5.1.-Empfängermäuse unterschieden werden konnten. Die Häufigkeiten der transferierten $CD8^+ CD45.2^+$ Zellen in Milz und Leber wurden errechnet, sowie die Häufigkeiten der Zytokin-Produzenten und Apoptose verglichen.

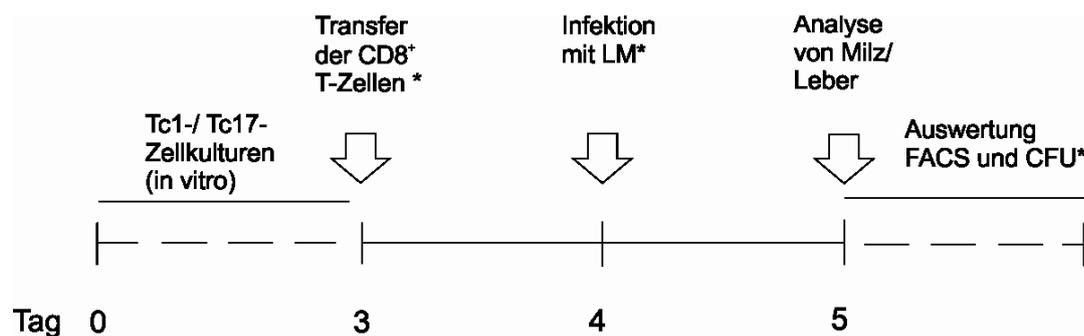


Abbildung 6: Schematischer Ablauf des LM-Infektionsversuches

CTLA4^{+/+} Tc1- sowie *CTLA4^{+/+} und CTLA4^{-/-} Tc17-* Zellkulturen wurden an Tag drei nach Primärstimulation geerntet und identische Anzahlen lebender (PI/Annexin-V) $CD8^+$ T-Zellen berechnet (1×10^6), in PBS aufgenommen und i.v. in Ly5.1. Empfängermäuse injiziert. Nach 24 h erfolgte die i.v. LM-Infektion (1×10^5 CFU). Weitere 24 h später wurden Milzen und Lebern entnommen. Zellsuspensionen wurden auf die LM-Last (in CFU) und detektierbare T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die mit * gekennzeichneten Schritte (i.v. Transfer der T-Zellen, i.v. LM-Infektion und CFU-Auswertung) wurden durch Herrn Dr. Nishanth Gopala, Institut für Medizinische Mikrobiologie durchgeführt. Der Versuch wurde insgesamt viermal durchgeführt.

7.2.9 Statistik

Daten wurden (falls nicht anders angegeben) als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Zum Vergleich von Zytokinproduktion und Apoptose wurde der unpaare t-Test (zweiseitig) genutzt. Für den Vergleich der Listerien-CFU wurde der Mann-Whitney U-Test (zweiseitig) genutzt. Ns (nicht signifikant) $p > 0.05$; * (signifikant) $p < 0.05$; ** (signifikant) $p < 0.01$; *** (signifikant) $p < 0.001$.

8 Ergebnisse

8.1 Naive CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} OT.1-Zellen zeigen eine ähnliche Expression von Aktivierungs-induzierten Rezeptoren und Zytokinen

Im Gegensatz zu T-Zellen aus CTLA-4^{-/-} Mäusen, die nach wenigen Lebenswochen eine letale lymphoproliferative Erkrankung entwickeln [89], weisen CD8⁺ T-Zellen von CTLA-4^{-/-} OT.1 Mäusen über deutlich längere Zeit normale Aktivitätszustände auf [91],[100]. Um zu bestätigen, dass sich die verwendeten, naiven CD62L⁺ CD8⁺ T-Zellen aus CTLA-4^{+/+} bzw. CTLA-4^{-/-} OT.1-Mäusen phänotypisch in einem nicht aktivierten Zustand befinden, wurden aktivierungsabhängige Zelloberflächenmoleküle wie CD44, CD62L, CD69 und CD127 durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 7, obere Reihe). Die hierbei nachweisbare Expression aller Surrogatparameter war vergleichbar und legte nahe, dass es sich um naive CTLA-4^{+/+} (grau) und CTLA-4^{-/-} (weiss-transparent) CD8⁺ T-Zellen handelte. Eine Bildung von IL-17, IFN- γ oder TNF- α konnte dementsprechend in CTLA-4^{+/+} (grau) und CTLA-4^{-/-} (weiss-transparent) CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch ausgeschlossen werden (Abb. 7, untere Reihe). Diese Ergebnisse belegen, dass sich die naiven CTLA-4^{+/+} bzw. CTLA-4^{-/-} CD8⁺ OT.1 T-Zellen in ähnlichen phänotypischen Aktivierungs- und Differenzierungsstadien befanden.

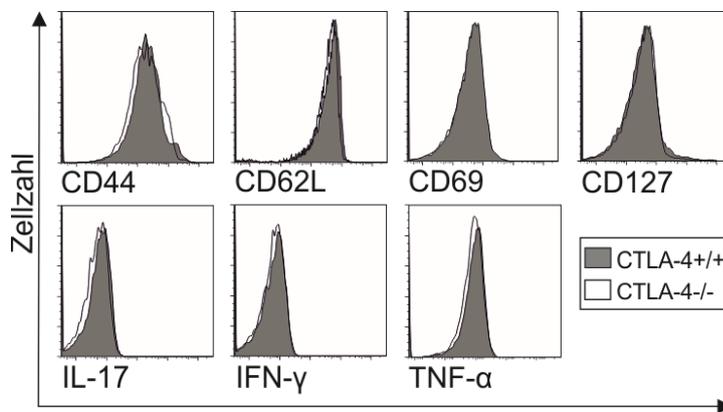


Abbildung 7: Phänotypische Ähnlichkeit naiver CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} OT.1-Zellen

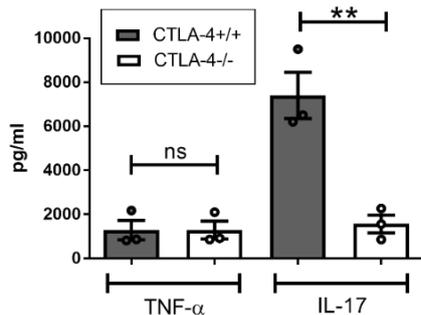
Unstimulierte CTLA-4^{+/+} (grau) bzw. CTLA-4^{-/-} (transparent) CD8⁺ CD62L⁺ OT.1-Zellen wurden durchflusszytometrisch bezüglich der Expression von Oberflächenmolekülen wie CD62L, CD44, CD69, CD127 (obere Reihe) sowie der intrazellulären Zytokine IL-17, IFN- γ und TNF- α (untere Reihe) verglichen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens vier unabhängigen Versuchen. Die CD62L- und CD44-Expression von CTLA-4^{+/+} bzw. CTLA-4^{-/-} CD8⁺ OT.1 T-Zellen wurde routinemäßig vor jedem Versuch kontrolliert.

8.2 CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen produzieren mehr IL-17 als CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen

Um den Einfluss von CTLA-4 auf die IL-17-Bildung in Tc17-Zellen zu untersuchen, wurden naive CTLA-4^{+/+} bzw. CTLA-4^{-/-} CD62L⁺ CD8⁺ OT.1 T-Zellen mit APZ durch OVA₂₅₇₋₂₆₄ antigenspezifisch unter Tc17-Bedingungen aktiviert (noch ohne anti-IL-2, ansonsten wie unter 7.2.2 Zellkulturen beschrieben).

Zum Vergleich wurde die IL-17-Bildung an identischen Zeitpunkten in Tc1-Kulturen (ohne Zugabe von polarisierenden Zytokinen) gemessen. Die IL-17-Konzentration in den Zellkultur-Überständen CTLA-4-kompetenter Tc17-Zellen (grau) war dabei im Vergleich zu CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen (weiss-transparent) ungefähr 5-fach erhöht (Abb. 8 A). Die TNF- α -Konzentrationen waren hingegen jeweils niedrig und unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,9951$). Dies verdeutlicht, dass CTLA-4 nicht generell aktivitätsabhängige Zytokine beeinflusst, sondern spezifisch IL-17 reguliert.

A)



B)

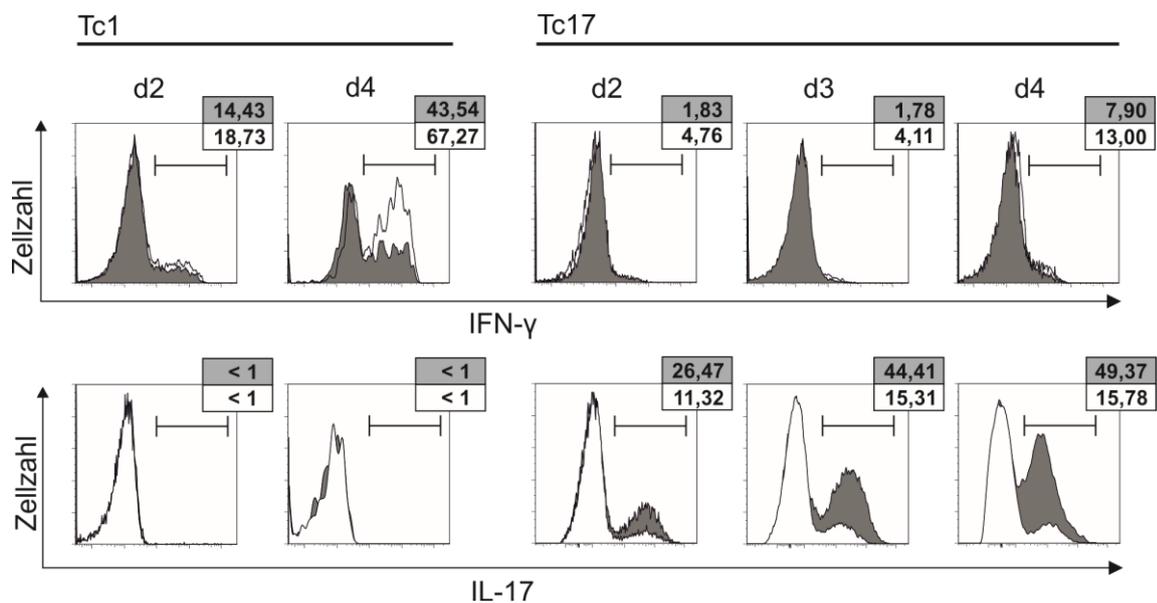


Abbildung 8: IL-17-, IFN- γ - und TNF- α -Bildung von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen

Naive CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} OT.1 CD8⁺ T-Zellen wurden (ohne anti-IL-2, ansonsten wie in Material und Methoden beschrieben) antigenspezifisch unter Tc1- oder Tc17-Bedingungen aktiviert. **A)** IL-17- und TNF- α -Konzentrationen in Zellkultur-Überständen der CTLA-4^{+/+} (grau) bzw. CTLA-4^{-/-} (weiss-transparent) Tc17-Kulturen wurden an Tag drei nach Primärstimulation mittels Cytometric Bead Array (CBA) quantifiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler von drei Konzentrationsbestimmungen aus drei unabhängigen, identisch durchgeführten Versuchen ($n=3$). Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen unpaaren t-Test berechnet. *Ns* (nicht signifikant), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **B)** CTLA-4^{+/+} (grau) und CTLA-4^{-/-} (weiss-transparent) Tc1- (links) oder Tc17-Zellen (rechts) wurden an den angegebenen Zeitpunkten nach Primärstimulation auf intrazelluläre IFN- γ - (obere Reihe) bzw. IL-17-Bildung (untere Reihe) mittels Durchflusszytometrie analysiert (Angabe in %). Daten in Histogrammform zeigen repräsentative Ergebnisse von einem aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Als nächstes wurde die Bildung von IFN- γ (Abb. 8 B, obere Reihe) und IL-17 (Abb. 8 B, untere Reihe) durchflusszytometrisch auf Einzelzellebene an verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Übereinstimmend mit vorherigen Arbeiten [91],[100] zeigte sich, dass CTLA-4 die IFN- γ -Bildung in Tc1-Zellen inhibiert (Abb. 8 B, obere Reihe, „Tc1“). Dementsprechend waren CTLA-4^{-/-} Tc1-Zellen (weiss-transparent) an Tag vier zu ca. 67% IFN- γ ⁺, während CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen (grau) nur ca. 44% IFN- γ -Produktion zeigten. Unter Tc1-Bedingungen bildeten weder CTLA-4^{+/+} noch CTLA-4^{-/-} Tc1-Zellen signifikante Mengen an IL-17 (Abb. 8 B, untere Reihe, „Tc1“). Unter Tc17-Bedingungen hingegen war die IFN- γ -Bildung stark supprimiert (Abb. 8 B, obere Reihe, „Tc17“), jedoch wie in früheren Arbeiten auf geringem Niveau nachweisbar [30],[31]: CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigten bis Tag vier einen Anstieg von ca. 4 % auf 13 % IFN- γ -Produzenten, während CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen im selben Intervall nur von 2% auf 8% IFN- γ -Produzenten anstiegen.

IL-17 war an frühen Zeitpunkten nach Primärstimulation (24 h) weder in CTLA-4^{+/+} noch in CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen in signifikanten Mengen nachweisbar (jeweils <2%, Daten nicht gezeigt). Im zeitlichen Verlauf war jedoch eine deutliche Zunahme der IL-17-Bildung feststellbar: CTLA-4-kompetente Tc17-Zellen (grau) wiesen im Vergleich zu CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen (weiss-transparent) an Tag zwei nach Primärstimulation eine doppelt so hohe Anzahl an IL-17⁺ CD8⁺ T-Zellen und ab drei Tagen sogar eine dreifach erhöhte Anzahl an IL-17-Produzenten auf (Abb. 8 B, untere Reihe, „Tc17“). Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass CTLA-4 die Häufigkeit von IL-17-bildenden Tc17-Zellen eindeutig erhöht.

8.3 Weder CTLA-4^{+/+} noch CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen bilden detektierbare Mengen an IL-4, Foxp3, IL-10 oder Granzyme B

Da CTLA-4 Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung nehmen kann [100],[146], überprüften wir nun die Expression zentraler Faktoren der Tc2- und Treg-Programme. Die charakteristischen Faktoren IL-4 (für Tc2) und Foxp3 (für Treg) waren in Tc17-Zellen durchflusszytometrisch unabhängig von CTLA-4-Signalen an Tag zwei nach Primärstimulation praktisch nicht nachweisbar (jeweils unter 1%), so dass eine distinkte Beeinflussung der Tc2- oder Treg-Differenzierung ausgeschlossen werden konnte (Abb. 9 A, obere Reihe). Um die CTLA-4^{+/+} (grau) und CTLA-4^{-/-} (weiss-transparent) Tc17-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die Expression von IL-2, IL-10, TNF- α , Granzyme B und FasL im Vergleich zu CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen (weiss-gestrichelt) gemessen (Abb. 9 A, untere Reihe). Tc1-Zellen bildeten wie erwartet vor allem IFN- γ und Granzyme B (Abb. 9 A, untere Reihe und Abb. 9 B). TNF- α war sowohl in Tc1-, als auch in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zu ähnlichen Häufigkeiten nachweisbar. CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigten nach Primärstimulation eine ähnliche Expression von IL-10, IL-2, TNF- α , FasL und Granzyme B. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass CTLA-4 unter Tc17-Bedingungen spezifisch die IL-17-Bildung steuert.

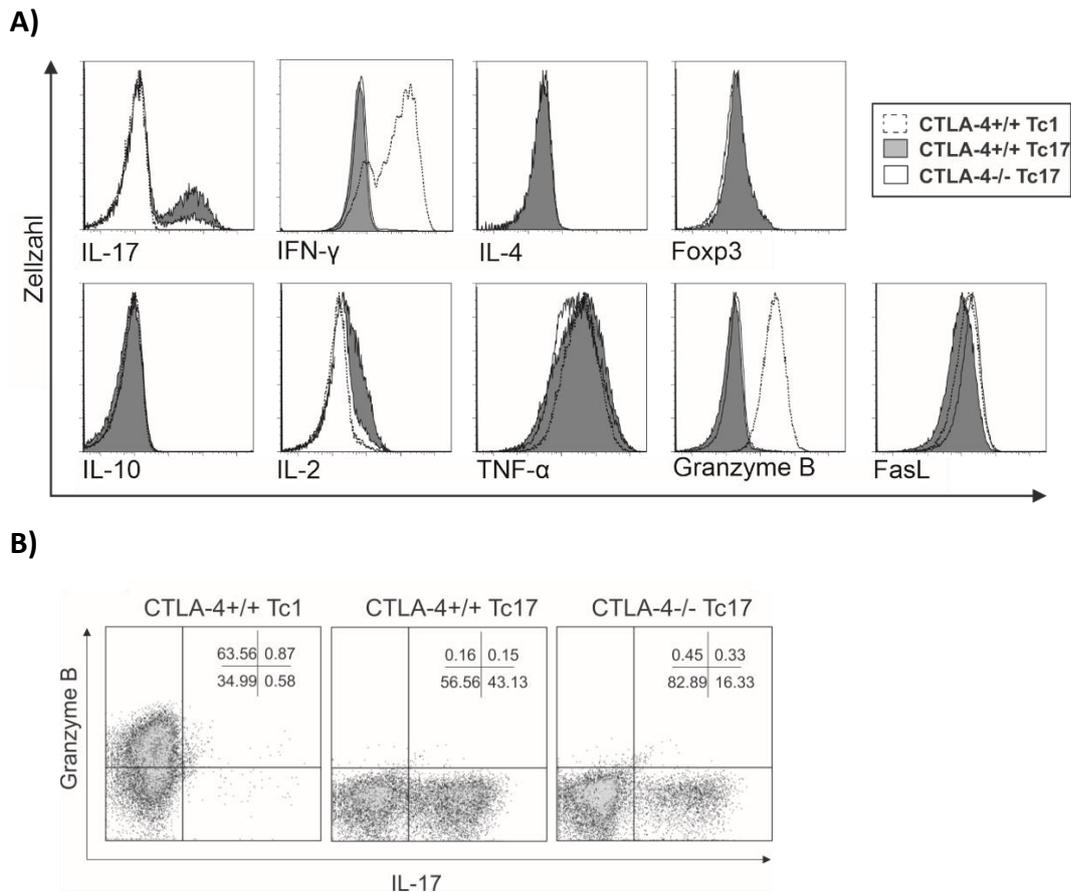


Abbildung 9: Phänotypischer Vergleich von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen

Naive CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} OT.1 CD8⁺ T-Zellen wurden antigenspezifisch unter Tc1- bzw. Tc17-Bedingungen aktiviert. A) Durchflusszytometrische Messung von IL-17, IFN- γ , IL-4, Foxp3, IL-10, IL-2, TNF- α , Granzyme B und FasL an Tag drei nach Primärstimulation in CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen (weiss-gepunktet), CTLA-4^{+/+} (grau) bzw. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (weiss-transparent). Die Daten in Histogrammform repräsentieren Ergebnisse aus einem von mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit identischen Ergebnissen. B) Intrazelluläre Färbung von Granzyme B und IL-17 in CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen (links), CTLA-4^{+/+} (mittig) bzw. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (rechts) im Dotplot (Angaben in % der CD8⁺ Zellen). Daten repräsentieren Ergebnisse aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

8.4 IL-2 und IFN- γ sind nicht für die unterschiedliche Bildung von IL-17 in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen verantwortlich

Eine verstärkte IFN- γ -Bildung in CTLA-4^{-/-} Tc1-Zellen wurde bereits beschrieben [91],[100]. Da IL-2 und IFN- γ inhibitorisch auf die Tc17-Differenzierung wirken [30],[66], wurde nun untersucht, ob der beobachtete Effekt von CTLA-4 auf die IL-17-Bildung durch diese Zytokine bedingt war. Hierzu wurden Tc17-Zellkulturen angesetzt, in denen durch die Hinzugabe von Antikörpern IL-2 bzw. IFN- γ neutralisiert wurden. Aus den Zellkultur-Überständen der Tc17-Zellen mit bzw. ohne anti-IL-2-Zusatz wurden zunächst die Konzentrationen der sezernierten Zytokine IL-17, IL-2 und TNF- α mittels CBA bestimmt (Abb. 10 A). IL-2 war kaum detektierbar (CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} ohne anti-IL-2: jeweils unter 60 pg/ml) und nach Zusatz von anti-IL-2 nicht mehr nachweisbar, was für eine effektive Neutralisierung von IL-2 sprach. Die TNF- α -Bildung in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen war nach

Primärstimulation vergleichbar hoch und wurde durch anti-IL-2 nicht wesentlich beeinflusst. Die IL-17-Bildung der CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen wurde durch Hinzugabe von anti-IL-2 deutlich um ca. 60 % gesteigert, was übereinstimmend mit früheren Daten den Tc17-inhibierenden Effekt von IL-2 verdeutlichte [33]. Der *relative* Unterschied in der IL-17-Produktion zwischen CTLA-4^{-/-} und CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen blieb jedoch erhalten. Auch durchflusszytometrisch (Abb. 10 B, links) wiesen CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen mit Zusatz von anti-IL-2 insgesamt zwei-bis dreifach erhöhte Anzahlen an IL-17⁺ CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Tc17-Kulturen ohne anti-IL-2 auf. Der relative Unterschied in der IL-17-Produktion, d.h. dass CTLA-4-kompetente Tc17-Zellen signifikant mehr IL-17 bildeten als CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen, war jedoch sowohl mit als auch ohne anti-IL-2 nachweisbar (Abb. 10 B, links).

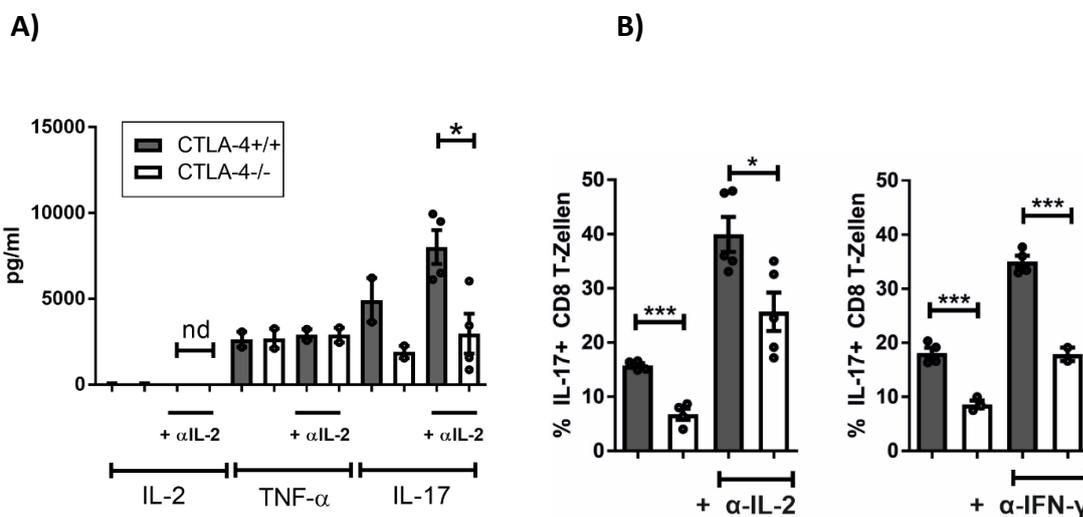


Abbildung 10: Der Einfluss von CTLA-4 auf die Tc17-Differenzierung ist unabhängig von IFN- γ und IL-2

CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellkulturen wurden mit bzw. ohne Hinzugabe eines Antikörpers gegen IL-2 bzw. IFN- γ angesetzt und an Tag drei nach Primärstimulation analysiert. A) Konzentrationen von IL-2, IL-17 und TNF- α in den Zellkultur-Überständen wurde mittels Cytometric Bead Array (CBA) quantifiziert. Nd = non detectable. B) Darstellung der Anteile der durchflusszytometrisch IL-17⁺ CD8⁺ T-Zellen in %. A-B) Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der zusammengefassten Ergebnisse aus jeweils zwei (Tc17-Kulturen ohne anti-IL-2) bzw. vier – fünf (Tc17-Zellkulturen mit anti-IL-2 bzw. anti-IFN- γ) unabhängigen Experimenten identischer Durchführung. Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen unpaaren t-Test berechnet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Auch durch Hinzugabe von anti-IFN- γ (Abb. 10 B, rechts) ließen sich die Anzahlen IL-17⁺ CD8⁺ T-Zellen in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Kulturen verdoppeln. Die *relativen* Unterschiede in der IL-17-Bildung zwischen CTLA-4^{-/-} und CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen bestanden jedoch weiterhin sowohl mit als auch ohne Zusatz von anti-IFN- γ . Bei geringen Häufigkeiten von IFN- γ ⁺ Tc17-Zellen (jeweils < 2,5%) konnte kein signifikantes Ergebnis bezüglich des Einflusses von CTLA-4 auf den Anteil IFN- γ ⁺/IL-17⁺ bzw. IFN⁺/IL-17⁺ Tc17-Zellen ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst widerlegten die Daten, dass ausschließlich IL-2 und IFN- γ als extrinsische Faktoren für die CTLA-4-vermittelte Verstärkung der IL-

IL-17-Bildung verantwortlich sind. Die Daten verdeutlichen die bereits beschriebenen inhibitorischen Wirkungen von IL-2 und IFN- γ auf die Tc17-Differenzierung. In den folgenden Experimenten wurden daher anti-IL-2 und anti-IFN- γ routinemäßig zur Optimierung der Tc17-Kulturbedingungen genutzt.

8.5 CTLA-4 vermittelt über T-Zell-intrinsische Mechanismen die Verstärkung der IL-17-Bildung

Es ist bekannt, dass CTLA-4 die Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle CD80 und CD86 auf APZ reguliert [99] und so die Kostimulation von T-Zellen auch indirekt kontrolliert. Außerdem könnten andere Zytokine als IL-2 oder IFN- γ in der Lage sein, CTLA-4^{-/-} und CTLA-4^{+/+} CD8⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Graden zu beeinflussen. So ist IL-21 in der Lage, die IL-17-Produktion IRF-4-abhängig zu fördern [32] und Eomes zu supprimieren [71]. Um zu untersuchen, ob der Effekt von CTLA-4 auf die IL-17-Bildung indirekt, also z.B. durch lösliche Faktoren im Zellkulturmedium oder durch APZ zell-extrinsisch vermittelt wird, wurde ein Ko-Kultur-Experiment durchgeführt. Dadurch war es möglich, CTLA-4^{-/-} und CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen in *einer* Zellkultur bei identischen Bedingungen zu kultivieren, jedoch die Zellen getrennt zu analysieren. Hierzu wurden naive CTLA-4^{-/-} und CTLA-4^{+/+} OT.1 CD8⁺ T-Zellen zu identischen Verhältnissen vermischt, nachdem zuvor eine der beiden Fraktionen mit CFSE markiert worden und somit von der ungefärbten Fraktion durchflusszytometrisch zu unterscheiden war (s. 7.2.5 Ko-Kulturen). Dieser CD8⁺ T-Zellen-Mix wurde anschließend mit APZ, OVA₂₅₇₋₂₆₄ und Zytokinen unter identischen Tc17-Bedingungen (mit anti-IL-2 und anti-IFN- γ) als Ko-Kultur angesetzt. Der Versuch wurde ebenfalls *vice versa* durchgeführt.

Drei Tage nach Primärstimulation wurden zunächst die Zellen CD8 oberflächengefärbt, um anhand von CFSE eine exakte Abtrennung beider CD8⁺ T-Zellpopulationen (CD8⁺ CFSE⁺ vs. CD8⁺ CFSE⁻) in der durchflusszytometrischen Analyse zu erreichen (Abb. 11, links). Bei der Analyse der CFSE⁻ CD8⁺ Zellen zeigte sich, dass die CTLA-4-vermittelte Verstärkung der IL-17-Produktion auch bei Ko-Kultivierung bestand hatte: Im Gegensatz zu CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen, die zu insgesamt ca. 20% IL-17⁺ waren, zeigten CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen zu 42,75 % IL-17-Bildung (Abb. 11, rechts, obere Reihe „CFSE negativ“). Obwohl nur CFSE⁻ CD8⁺ T-Zellen in die Analyse eingeschlossen wurden (um auszuschließen, dass der zellmembranpermeable Fluoreszenz-Farbstoff die IL-17-Bildung beeinflusst), verhielten sich die CFSE⁻ CD8⁺ T-Zellen analog (Abb. 11, rechts, untere Reihe „CFSE positiv“). Die Daten belegten, dass der von CTLA-4 vermittelte Effekt auf die IL-17-Bildung T-Zell-intrinsisch und unabhängig von extrinsischen Einflüssen, wie Zytokinen oder APZ, vermittelt wird. Unter optimalen Tc17-Kulturbedingungen (mit anti-IL-2 und anti-IFN- γ , Abb. 10) war die IFN- γ -Bildung in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eindeutig supprimiert (je < 3%).

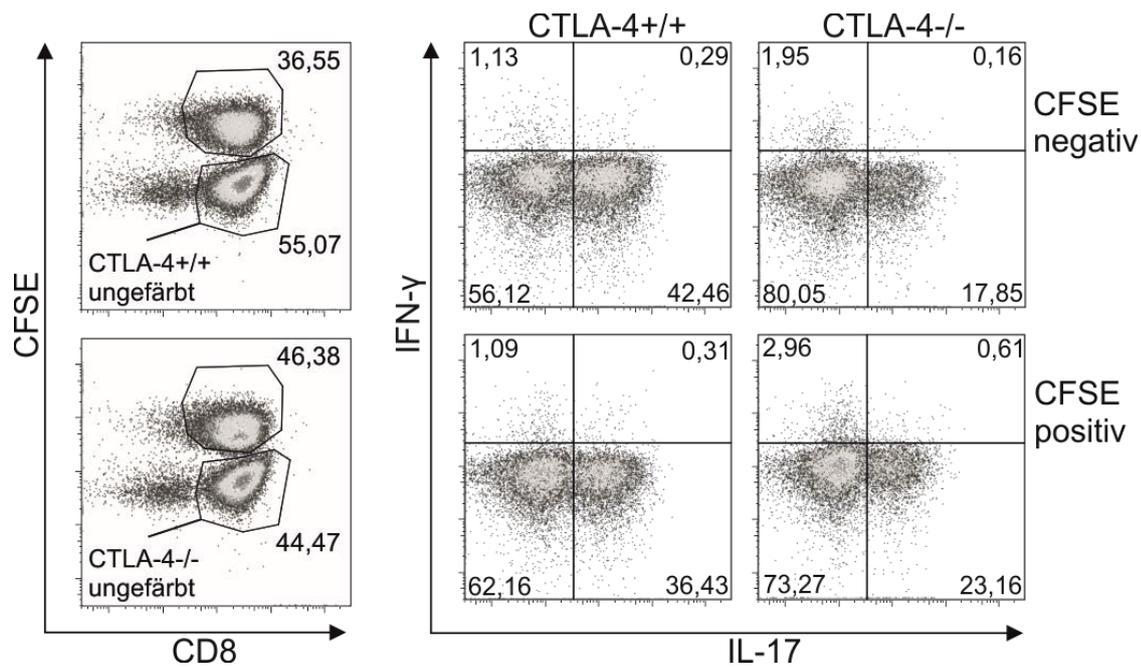


Abbildung 11: CTLA-4 verstärkt T-Zell-intrinsisch die IL-17-Bildung

CTLA-4^{+/+} oder CTLA-4^{-/-} CD8⁺ CD62L⁺ Zellen wurden mit CFSE (s. 7.2.5 Ko-Kulturen) angefärbt, während ihr Pendant ungefärbt blieb. Identische Anzahlen ungefärbter (CFSE⁻) und gefärbter (CFSE⁺) CD8⁺ Zellen wurden in einer gemeinsamen Tc17-Zellkultur durch Hinzugabe von OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid und APZ antigenspezifisch aktiviert. Das Experiment wurde ebenfalls vice versa durchgeführt. Drei Tage nach Primärstimulation wurden die Zellen CD8 oberflächengefärbt sowie die Bildung von IFN- γ und IL-17 durchflusszytometrisch geprüft. Gezeigt sind repräsentative Daten aus einem von zwei unabhängigen Versuchen.

8.6 Proliferation und Apoptose sind vergleichbar in aktivierten CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen

CTLA-4 wirkt inhibitorisch auf die T-Zell-Proliferation und proapoptotische Vorgänge in aktivierten CD4⁺ T-Zellen [147]. Dementsprechend wäre es möglich, dass ein unterschiedliches Proliferations- oder Apoptoseverhalten die IL-17-Bildung von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen beeinflusst. Als erstes wurden deshalb naive CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen vor Kulturansatz mit CFSE gefärbt (s. 7.2.4 Zellfärbungen), um das Proliferationsverhalten zu analysieren. Es zeigten sich dabei bis sieben Tage nach Primärstimulation ähnliche Proliferationsraten von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (Abb. 12 A, Versuche und Daten von Aditya Arra [148]). Als nächstes wurde die Expression Apoptose-assoziiierter Moleküle auf Tc17-Zellen verschiedener Stimulationsdauer verglichen. Die Anzahlen PI/Annexin-V⁻ negativer CD8⁺ Zellen wurden als nicht-apoptotisch gewertet und unterschieden sich nicht signifikant in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (Abb. 12 B). Somit waren Unterschiede im Proliferations- und Apoptoseverhalten der CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen als Ursache für die distinkte IL-17-Bildung unwahrscheinlich.

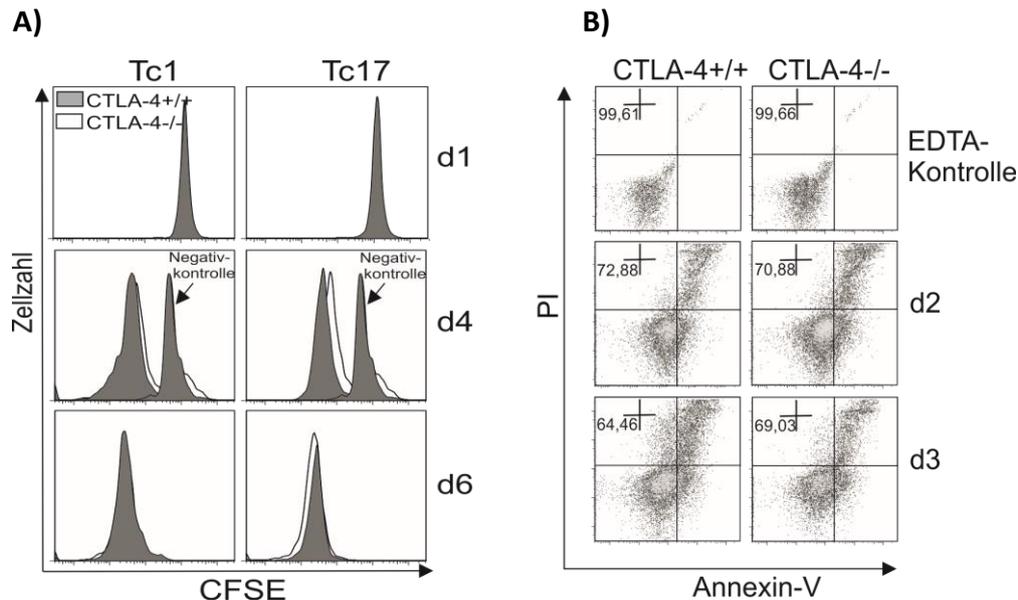


Abbildung 12: CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen ein ähnliches Proliferations- und Apoptoseverhalten

A) CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} CD8⁺ CD62L⁺ Zellen wurden mit CFSE angefärbt (wie in 7.2.4 beschrieben), bevor sie als Tc17-Zellkulturen angesetzt und an verschiedenen Tagen durchflusszytometrisch analysiert wurden (dargestellt als Histogramm). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Daten von Aditya Arra [148]. B) Apoptoseraten (in %) wurden nach Inkubation der Zellen mit PI und Annexin-V untersucht (wie in 7.1.4 beschrieben). PI⁺/Annexin-V⁻ CD8⁺ Zellen wurden als nicht-apoptotisch definiert. EDTA-behandelte Zellen (Tag 0) dienen als Negativkontrollen. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen, identischen Versuchen ist gezeigt.

8.7 Der CTLA-4-vermittelte Effekt auf Tc17-Zellen ist unabhängig von einer distinkten TZR-Stimulation

Die Stärke von TZR-Signalen beeinflusst die T-Zell-Differenzierung [149]. Die Experimente wurden deshalb mit verschiedenen Antigen-Konzentrationen (1, 0,1, 0,01 µg/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄) wiederholt. Hierbei konnte bei sämtlichen OVA₂₅₇₋₂₆₄-Konzentrationen in CTLA-4-kompetenten Tc17-Zellen eine durchgehend höhere IL-17-Bildung nachgewiesen werden (Daten von Aditya Arra [148],[150]; nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte auch in einem zweiten experimentellen System mittels Antikörper-vermittelter TZR-Stimulation eine erhöhte IL-17-Bildung in CTLA-4^{+/+} Zellen induziert werden (Daten von Aditya Arra [148],[150]). Dazu wurden naive CD8⁺ T-Zellen aus CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} OT.1-Mäusen unter Tc17-Bedingungen mit Latex-Beads stimuliert, die mit anti-CD3, anti-CD28 sowie mit bzw. ohne anti-CTLA-4 (induziert durch sog. Crosslinking ein agonistisches CTLA-4-Signal) gekoppelt waren. Mittels anti-CD3/CD28 aktivierte Tc17-Zellen, die zusätzlich agonistische CTLA-4-Signale erhielten, zeigten eine vierfach höhere IL-17-Bildung als ohne CTLA-4-Signal (d2: 30,20 % vs. 5,22 %; d3: 54,30% vs. 13,80%). Diese Daten zeigten, dass der Einfluss von CTLA-4 in Tc17-Zellen zell-intrinsisch und unabhängig von einer distinkten TZR-Stimulationsstärke oder kostimulatorischen Faktoren wie CD28 ist.

8.8 CTLA-4 erhöht die IL-17-Bildung pro Tc17-Zelle und fördert die Expression Tc17-relevanter Faktoren

Die iMFI ist das Produkt aus der MFI sowie der Häufigkeit der Zytokin-produzierenden Zellen und erlaubt eine Abschätzung der funktionellen Qualität der entsprechenden Zellen [145]. Es zeigte sich, dass die MFI der IL-17⁺ CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen höher war (7955 ± 110.3 vs. 6318 ± 83.89 ; $p < 0.0001$; $n = 6$), als in IL-17⁺ CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (Daten von Aditya Arra [148]). Da CTLA-4 die Frequenzen IL-17-bildender Tc17-Zellen erhöhte (Abb. 8-11) sowie die IL-17-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen CTLA-4-kompetenter Tc17-Zellen vielfach erhöht waren (Abb. 8, 10), deuteten diese Daten zusammenfassend darauf hin, dass CTLA-4 auch die qualitative Ausreifung der Tc17-Zellen nach Primärstimulation fördert.

Um den zugrundeliegenden, zell-intrinsischen Einfluss von CTLA-4 auf die Tc17-Differenzierung näher zu untersuchen, wurde im Folgenden die Expression Tc17-relevanter Faktoren in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen analysiert. Zum Vergleich dienten CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen. Zum einen wurden dazu Realtime-PCR-Analysen von CTLA-4^{+/+} Tc1-, CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen durchgeführt, die mit Hilfe von Herrn Dr. Roland Hartig, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, mittels FACS-Sortierung aus den jeweiligen Zellkulturen isoliert worden waren (CD8⁺ CD45.2⁺ Tc17- bzw. Tc1-Populationen). Zum anderen wurden spezifisch die IL-17-Produzenten der Tc17-Zellen untersucht, die mit Hilfe eines IL-17-Detektionskits per MACS isoliert worden waren (Versuche und Daten von Aditya Arra [148], Abb. 13 A). Sowohl in den gesamten CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellpopulationen (Daten nicht gezeigt), als auch in den purifizierten IL-17⁺ CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen (im Vergleich zu IL-17⁺ CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen) zeigten sich dabei ähnliche Transkriptionsmuster, die durch eine Erhöhung von IL-17A/F sowie zentraler Tc17-Faktoren wie RORc/α mRNA gekennzeichnet waren (Abb. 13 A). Der mRNA-Gehalt von Tc17-fördernden Faktoren wie IL-21, IRF-4, AHR und IL-23R war an Tag zwei nach Primärstimulation vergleichbar hoch, sank jedoch zu späteren Zeitpunkten (ab drei Tagen nach Primärstimulation) signifikant schneller in CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen ab (nicht signifikant bei AHR). Runx1 wurde v.a. in CTLA-4^{+/+} Tc17 ab Tag drei verstärkt exprimiert. SOCS3 mRNA wurde kaum in Tc1-Zellen gebildet und unterschied sich nicht signifikant in Tc17-Zellen (jedoch leicht erhöht in CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen ab Tag drei nachweisbar). SOCS1 mRNA war sowohl in Tc1- als auch Tc17-Zellen nachweisbar (leicht erhöht in Tc1- und CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen ab Tag drei im Vergleich zu CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen).

T-Bet mRNA war auf konstant niedrigem Niveau in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen nachweisbar, während Eomes mRNA zu späteren Zeitpunkten geringfügig erhöht in CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen nachweisbar wurde (Abb. 13 A). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte auch

durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass T-Bet-Protein deutlich in Tc1-Zellen (69,51%), jedoch nur geringfügig in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (3,02% vs. 3,76%) detektierbar war (Abb. 13 B; Daten von Aditya Arra [148]). CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen bildeten mehr ROR γ t-Protein als CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen. Die MFI von ROR γ t⁺ Zellen war dabei in CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen um ca. 40% höher als in CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (Abb. 13 B; Daten von Aditya Arra [148]). Zusammengefasst zeigten CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen eine verstärkte Expression von IL-17 sowie weiterer zentraler Tc17-Faktoren, die mit einer erhöhten ROR γ t-Expression assoziiert war.

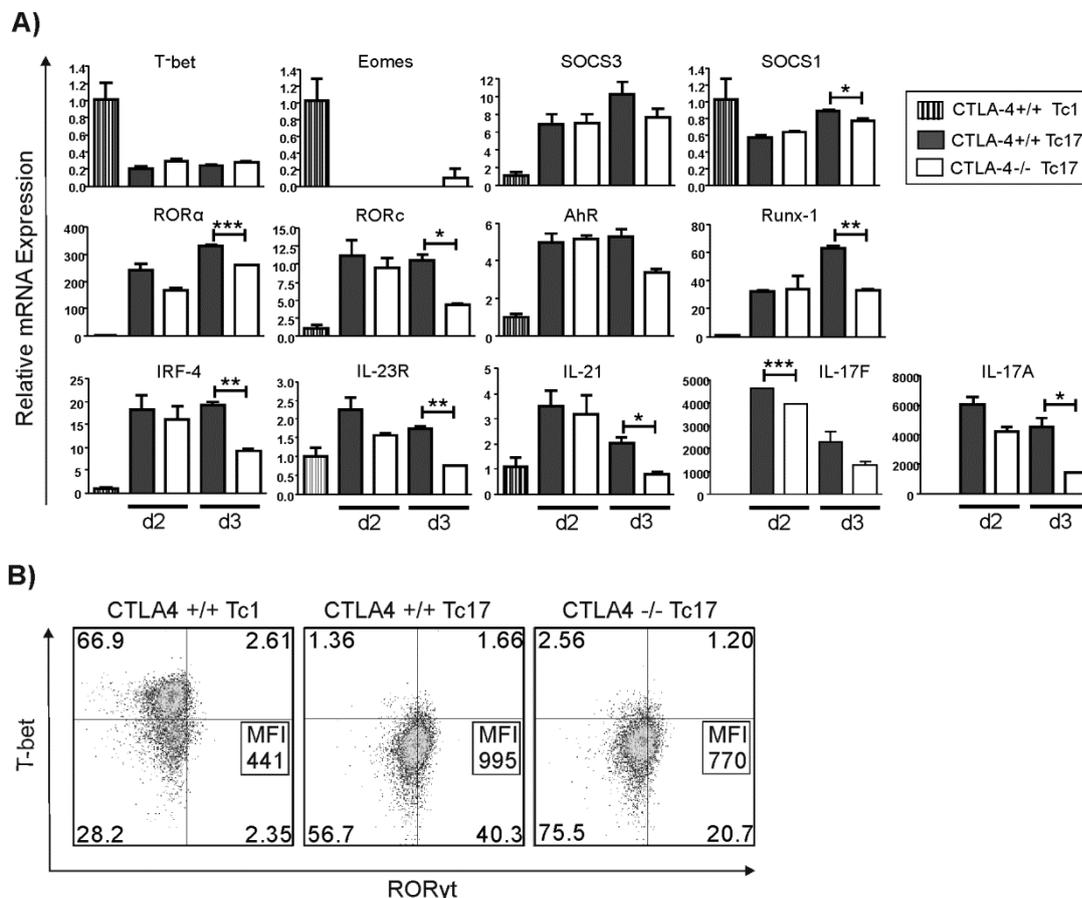


Abbildung 13: CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen zeigen eine verstärkte Expression Tc17-relevanter Faktoren

A) CTLA-4^{+/+} (grau) bzw. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (weiss) und CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen (weiss-gestreift) wurden an beschriebenen Zeitpunkten nach Primärstimulation (Tc1-Zellen an Tag drei nach Primärstimulation) geerntet. Lebende IL-17⁺ Tc17-Zellen wurden mit Hilfe des IL-17-Zytokin-Sekretion-Assays (Miltenyi Biotec) entsprechend des Hersteller-Protokolls bis zu einer Reinheit >98% per MACS angereichert. Anschließend erfolgte die Zellyse, RNA-Extraktion und Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkriptase (s. 7.2.7). Die Realtime-PCR erfolgte mit dem Referenzgen HPRT (Primersequenzen s. 15 Anlagen). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler von den zusammengefassten Duplikaten aus einem Experiment, repräsentativ für zwei unabhängige Experimenten identischer Durchführung mit gleichen Ergebnissen. Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen unpaaren t-Test berechnet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. B) Durchflusszytometrische Färbung von ROR γ t und T-Bet in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen an Tag drei nach Primärstimulation. A+B) Versuche und Daten von Aditya Arra [148].

8.9 CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine erhöhte Plastizität und Konversion zu einem Tc1-ähnlichen Phänotyp

Die Plastizität der Th17/Tc17-Zellen, d.h. die Veränderung des klassischen IL-17⁺ zu einem Th1/Tc1-ähnlichen Phänotyp ist ein vielfach beschriebenes Phänomen [30],[31],[56]. Frühere Daten zeigten jedoch, dass der Grad der Differenzierung für die Stabilität bedeutend sein kann. So zeigten „endgradig“ differenzierte Tc17/Th17-Zellen nach Restimulation unter Tc1-/Th1-Bedingungen einen stabileren Phänotyp [8],[63]. Da CTLA-4-Signale eine stärkere Tc17-Differenzierung zu bedingen schienen, sollte nun der Einfluss CTLA-4s auf die Tc17-Stabilität überprüft werden. Dazu wurden Tc17-Zellen unter Tc1-Bedingungen restimuliert. Zunächst wurden tote Zellen in einer Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt und lebende CD8⁺ T-Zellen mit frischen APZ und 1µg/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ bei identischen Versuchsbedingungen (ohne die Zugabe von Tc17-polarisierenden Zytokinen) antigenspezifisch an Tag fünf restimuliert. Es zeigte sich, dass sowohl CTLA-4^{+/+} als auch CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen ihre IL-17-Bildung auf Kosten einer steigenden IFN-γ-Bildung verloren (Abb. 14). Auffallend war jedoch, dass CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen nach Restimulation signifikant mehr intrazelluläres IL-17 (zusammen mit TNF-α) bildeten (9.13 ± 1.38 %), als CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen (1.49 ± 0.31 %; p=0,0057). Im Gegensatz dazu bildeten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen signifikant mehr IFN-γ/TNF-α (22.97 ± 1.67 % vs. 8.63 ± 1.84 %; p=0,0045).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass CTLA-4-vermittelte Signale den Tc17-Phänotyp stabilisieren und CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen - nach in-vitro Restimulation unter Tc1-Bedingungen - verstärkt in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp konvertieren. Es bleibt jedoch ungeklärt, ob die IFN-γ⁺/TNF-α⁺ Tc17-Zellen aus ehemals IFN-γ⁺, IL-17⁺/IFN-γ⁻ oder IL-17⁻/IFN-γ⁻ Subpopulationen stammen.

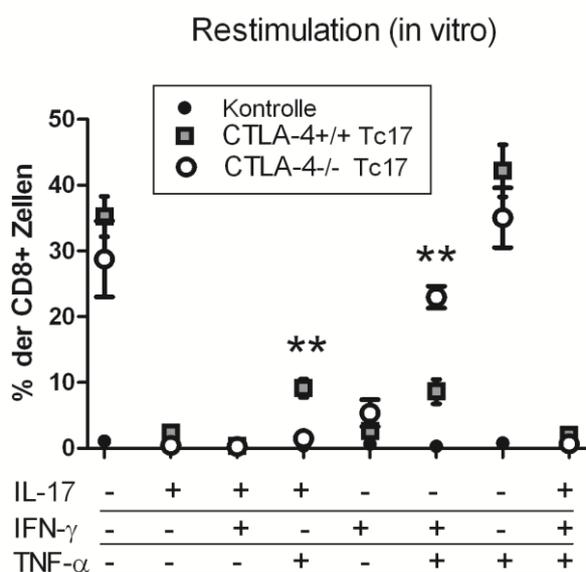


Abbildung 14: CTLA-4 stabilisiert den Tc17-Phänotyp in-vitro

Lebende CTLA-4^{+/+} bzw. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen wurden an Tag fünf nach Primärstimulation per Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und mit frischen APZ und OVA₂₅₇₋₂₆₄ ohne Zytokin-Zusatz restimuliert. Nach zwei Tagen wurden die restimulierten CD8⁺ Zellen durchflusszytometrisch auf IL-17-, IFN-γ- und TNF-α-Bildung untersucht (als Diagramm in % der CD8⁺ T-Zellen dargestellt). Als Kontrollen dienten unstimulierte CD8⁺ Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte aus zwei identisch durchgeführten Versuchen mit je 2 Proben (n=4). Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen unpaaren t-Test berechnet. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

8.10 Ein Listerien-Infektionsmodell zum Vergleich der Immunantworten von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen

Um den Einfluss CTLA-4s auf die Phänotyp-Stabilität von Tc17-Zellen in-vivo zu untersuchen, wurden die antigenspezifischen Immunantworten CTLA-4-kompetenter bzw. CTLA-4-defizienter Tc17-Zellen in einem murinen Infektionsmodell mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-transgenen *Listeria monocytogenes* (LM)-Stämmen verglichen. Die T-Zell-vermittelte LM-Immunantwort ist zu großen Anteilen von IFN- γ -, TNF- α - und Granzyme B-abhängig, die direkt auf infizierte Zellen oder indirekt, zum Beispiel über Aktivierung der zellulären, angeborenen Abwehr wie Makrophagen, wirken [151]. Dementsprechend wird das LM-Infektionsmodell zur Überprüfung von Tc1-Immunantworten herangezogen [151],[152]. Dies wurde indirekt ausgenutzt, da die Konversion in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp (und demzufolge die erhöhte LM-Abwehr) als Maß für die Tc17-Plastizität genutzt wurde.

Die folgenden Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schlüter, Institut für Medizinische Mikrobiologie, insbesondere mit Unterstützung von Herrn Dr. Nishanth Gopala durchgeführt. Zunächst wurden CTLA-4^{+/+} Tc1- sowie CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellkulturen in-vitro angesetzt. Die CD8⁺ T-Zellen bestätigten dabei an Tag drei nach Primärstimulation durchflusszytometrisch ihre typischen phänotypischen Profile (Tc1: IFN- γ ^{high}/Granzyme B^{high}; Tc17: IL-17^{high} (CTLA-4^{+/+} > CTLA-4^{-/-}), IFN- γ ^{low}, Granzyme B^{low}; vgl. Abb. 9 A, B). Nach Färbung der CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen mit PI und Annexin-V zeigten sich vergleichbare Anzahlen an apoptotischen Zellen (Daten nicht gezeigt; vgl. Abb. 12 B). Identische Zahlen nicht-apoptotischer (PI/Annexin-V) CD8⁺ Zellen wurden berechnet, und die entsprechenden Zellkulturen in PBS „bulk-cultured“ [56] über eine Schwanzvene in Ly5.1-Empfänger-Mäuse transferiert. Auf eine für ein IL-17-Sekretionsassay notwendige PMA/Ionomycin-Stimulation der Tc17-Zellen wurde verzichtet, um die in-vivo Funktion der CD8⁺ T-Zellen nicht zu beeinflussen. Durch CD45.2 ließen sich die transferierten CD8⁺ T-Zellen (CD45.2⁺) durchflusszytometrisch von Zellen der Empfängermäuse (CD45.2⁻) unterscheiden und spezifisch analysieren. 24 h nach T-Zelltransfer erfolgte die intravenöse Infektion mit einem rekombinanten OVA-I-exprimierenden LM-Stamm, der eine antigenspezifische Immunantwort der transferierten OT.1 T-Zellen auslöst. Um die Aktivierung endogener T-Zellen gering zu halten, wurde eine kurze Infektionszeit von 24 h sowie eine relativ hohe Infektionsdosis (1×10^5 CFU LM) gewählt [151],[152]. Nach Injektion reichern sich LM innerhalb weniger Stunden in Milz und Leber an [153], wo sie von APZ aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden. Nach 24 h Infektionszeit wurden die hepatischen und splenischen LM-CFU als Maß der Immunantwort gegen LM mikroskopisch bestimmt (Durchführung und Daten vom Institut für Medizinische Mikrobiologie). Nach Verarbeitung der hepatischen und splenischen Homogenisate (s. 7.2.8 In-vivo Experimente) wurden die transferierten CD45.2⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Um die Reinheit der transferierten CD8⁺ T-Zellen zu kontrollieren, wurde der Anteil an TCR-V α 2⁺ Zellen (TCR-V α 2 ist ein Teil des transgenen TZR) von den CD45.2⁺ Splenozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Hierbei zeigte sich ein TCR-V α 2⁺ T-Zellen-Anteil in den transferierten Tc1- bzw. Tc17-Gruppen von 98% (Abb. 15 A, beispielhaft für CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen dargestellt). Dies bestätigte, dass die detektierbaren, transferierten Zellen fast ausschließlich OT.1 T-Zellen waren.

8.11 CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine mit Tc1-Zellen vergleichbare, effektive Listerien-Abwehr in-vivo.

CTLA-4^{+/+} Tc1-Zellen wurden aufgrund der effektiven LM-Immunantwort als Positivkontrollen genutzt und reduzierten die LM-Last sowohl in der Milz als auch in der Leber am deutlichsten (Abb. 15 B). CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen zeigten 24 h nach Infektion gegenüber der Negativkontrolle nur eine geringe CD8⁺ T-Zell-vermittelte LM-Immunität in Leber und Milz. Im Gegensatz dazu waren CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen in der Lage, die CFU in Milz und Leber gegenüber der PBS-Kontrolle deutlich zu reduzieren und waren diesbezüglich mit Tc1-Zellen vergleichbar (CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen vs. Tc1-Zellen; Milz: p= 0,085; Leber: p= 0,051; n=4-5 je Gruppe). Auch im Vergleich zu CTLA-4-kompetenten Tc17-Zellen zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine signifikante Reduzierung der LM-CFU in Milz und Leber (Milz: p= 0,016; Leber: p= 0,008; n=4-5 je Gruppe). Demzufolge zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine erhöhte LM-Immunität und waren dabei ähnlich effektiv wie Tc1-Zellen.

Da unterschiedliche Anzahlen an CD8⁺ T-Zellen die Unterschiede erklären könnten und erhöhte Persistenzen von Tc17-Zellen in diversen In-vivo-Modellen beschrieben worden sind [31],[56],[154], sollte als nächstes die Anzahl der detektierbaren transferierten CD8⁺ T-Zellen verglichen werden (Abb. 15 C). Trotz der signifikanten Unterschiede in der LM-Immunität konnten keine quantitativen Unterschiede bei den absoluten Zellzahlen der Tc17-Gruppen gefunden werden (Abb. 15 C). Zellen beider Tc17-Gruppen waren insgesamt in signifikant höheren Anzahlen detektierbar als Tc1-Zellen, die die höchste LM-Immunität aufwiesen (Abb. 15 B).

Um erhöhte Apoptose der CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen auszuschließen, wurden Splenozyten mit PI und Annexin-V angefärbt. CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigten dabei ähnliche Anzahlen nicht-apoptotischer Zellen (70,2% bzw. 77,7%), so dass die Immunantworten nicht durch distinkte Apoptose bedingt sein konnten. Aufgrund der geringen Anzahl detektierbarer Tc1-Zellen war eine adäquate Apoptosemessung nicht möglich. Sowohl CTLA-4^{+/+} als auch CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigten eine vergleichbare Expression von KLRG-1 und IL-7R (Abb. 15 D). Zusammengefasst zeigten Tc1-Zellen trotz einer deutlich geringeren Zellzahl eine äußerst effektive Immunantwort gegen LM, während sich die Zellzahlen sowie das Apoptoseverhalten der Tc17-Gruppen nicht signifikant unterschieden.

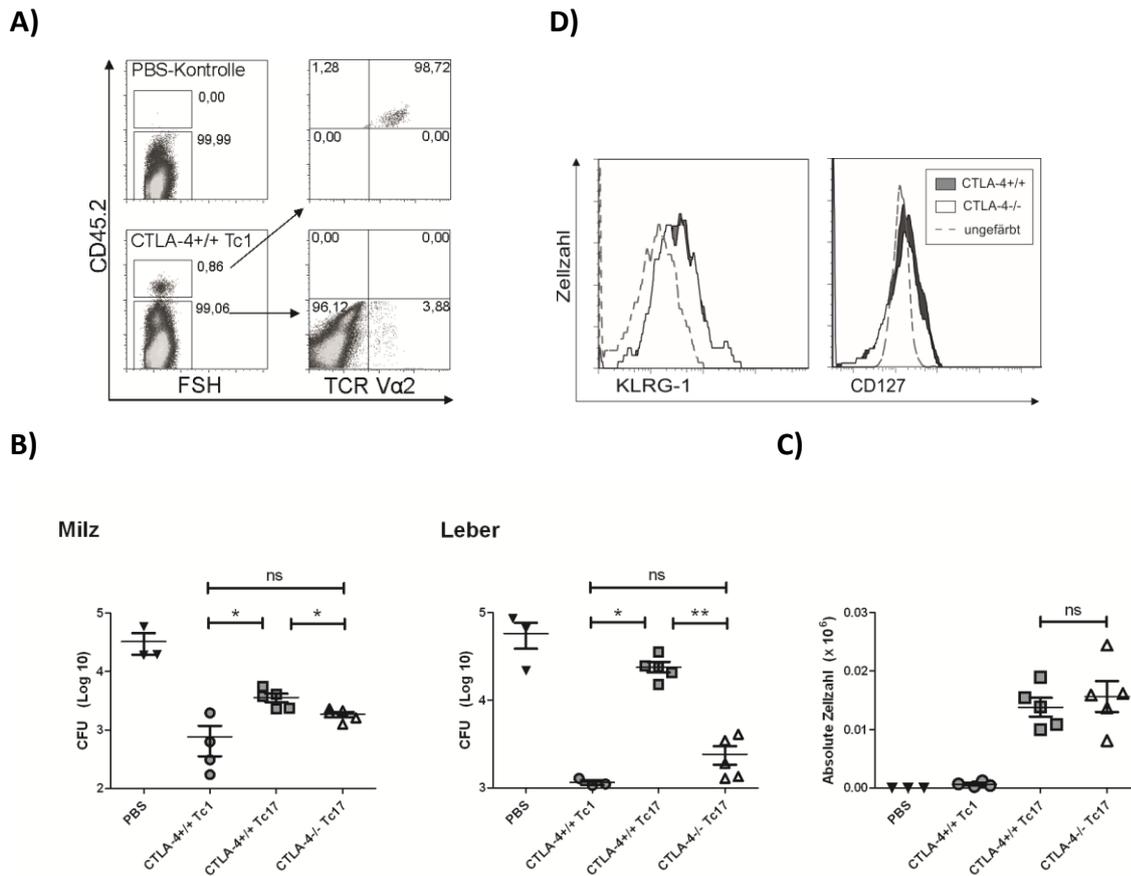


Abbildung 15: Listeria monocytogenes-Immunität von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen

CTLA-4^{+/+} Tc1- und CTLA-4^{+/+} bzw. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellkulturen wurden wie in 7.2.2 beschrieben angesetzt. An Tag drei nach Primärstimulation wurden 1×10^6 lebende CD8⁺ CD45.2⁺ T-Zellen i.v. in Ly5.1-Empfängermäuse injiziert (bzw. als Negativkontrolle PBS). 24 h später erfolgte eine i.v. Infektion mit LM (mit Hilfe des Institutes für Medizinische Mikrobiologie; s. 7.2.8). Weitere 24 h nach der Infektion wurden die Organe aus den Empfängermäusen entnommen, homogenisiert und analysiert. A.) Ly5.1.-Splenozyten wurden ex-vivo auf TCR-Va2 (charakterisiert TZR-transgene OT.1-Zellen) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Anteil der TCRVa2⁺ Zellen in % aller CD45.2⁺ Zellen). Repräsentative Ergebnisse der Tc1-Gruppe aus einem von 4 unabhängigen Experimenten (jeweils 3-5 Mäuse/Gruppe) sind gezeigt. B) Scatter dot plots mit Anzahl der mikroskopisch nachweisbaren LM-CFU (log 10) 24 h nach Infektion in Milz (links) und Leber (rechts) der Empfängermäuse (Arbeit und Daten des Institutes für Medizinische Mikrobiologie). Ausgefüllte Symbole repräsentieren einzelne Mäuse, Balken bzw. Fehlerbalken stellen Mittelwerte mit Standardfehlern pro Gruppe dar. Die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Daten von einem aus drei unabhängigen Experimenten (mit je drei bis fünf Mäusen pro Gruppe/Experiment). Ein Ausreißer wurde mittels Grubb's Test identifiziert und von der Statistik ausgeschlossen. C) Scatter dot plots mit Zellzahlen der transferierten CTLA-4^{+/+} Tc1- und CTLA-4^{-/-} bzw. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen 24 h nach LM-Infektion. Nach Oberflächenfärbung wurden die absoluten CD8⁺ CD45.2⁺ Zellzahlen aus der Anzahl der Splenozyten ($2,5 \times 10^6$), der relativen CD8⁺ CD45.2⁺ Zellfrequenz, sowie der durchschnittlichen absoluten Splenozyten-Zahl ($32,4 \times 10^6$) berechnet. Die statistische Analyse wurde mittels unpaaren t-Test (zweiseitig) durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Daten von einem aus drei unabhängigen Experimenten (mit 3 bis 5 Mäusen pro Gruppe/Experiment). D) Durchflusszytometrischer Vergleich der KLRG-1 und IL-7R/CD127-Expression der transferierten CD45.2⁺ CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen 24 h nach LM-Infektion. Daten in Histogrammform repräsentieren Ergebnisse aus einem von mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen. Ns (nicht signifikant). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

8.12 CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen nach Transfer eine erhöhte Koexpression von Zytokinen

Aufgrund der Daten erschien es wahrscheinlich, dass die distinkte LM-Immunität auf CTLA-4-abhängigen, qualitativen Unterschieden der Tc17-Zellen beruhen könnte. Frühere Studien zeigten eine FasL-abhängige Immunantwort von Tc17-Zellen in einem Vaccinia-Infektionsmodell [154]. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der FasL-Expression von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen vor (Abb. 9 A) bzw. nach Transfer festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Da Unterschiede in der Plastizität und demzufolge der Zytokinproduktion erheblichen Einfluss auf die Immunantwort gegen LM haben könnten [152],[155], wurde im Folgenden die Bildung von IFN- γ , TNF- α , IL-17 und Granzyme B verglichen. Hinsichtlich des Tc17-Phänotyps verloren sowohl CTLA-4^{+/+} als auch CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen weitgehend ihre IL-17-Monoproduktion (Abb. 16 A). CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen wiesen eine insgesamt höhere Koexpression von IL-17/IFN- γ auf (7.24 ± 0.73 % vs. 3.67 ± 0.95 %, $p=0,0181$; $n=5$). Vergleichbar mit den in-vitro Ergebnissen (Abb. 14) zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen nach in-vivo-Restimulation mehr IFN- γ ⁺/TNF- α ^{high}-Doppelproduzenten als CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen (Abb. 16 A; $14.78 \pm 0.77\%$ vs. $10.93 \pm 0.69\%$; $p=0,006$; $n=5$) im Sinne einer gesteigerten Plastizität.

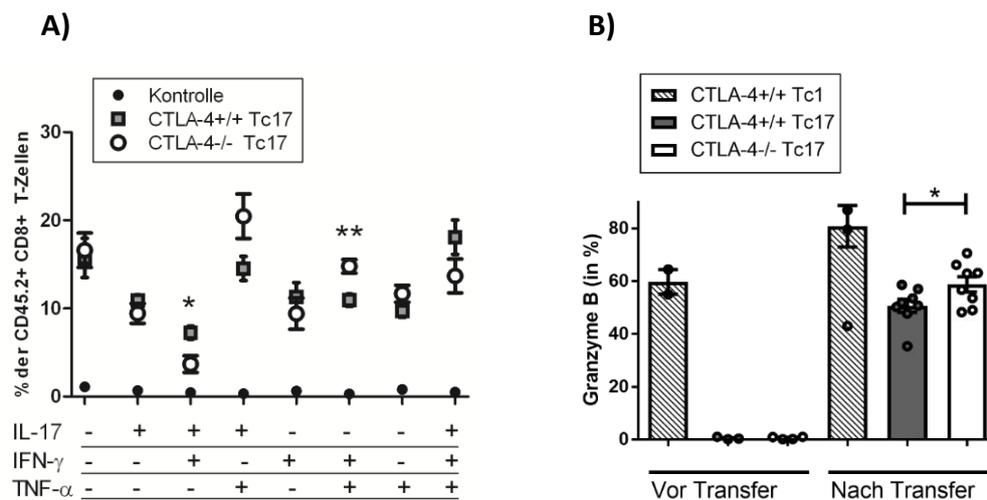


Abbildung 16: CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine stärkere polyfunktionale Zytokinbildung

CTLA-4^{+/+} Tc1⁻, CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellkulturen wurden in-vitro angesetzt (s. 7.2.2). Drei Tage nach Primärstimulation wurden identische Anzahlen lebender CD8⁺ CD45.2⁺ T-Zellen bzw. als Negativkontrolle PBS i.v. in Ly5.1-Mäuse (CD45.2⁻) injiziert (mit Hilfe des Institutes für Medizinische Mikrobiologie; s. 7.2.8). Nach 24 h erfolgte die i.v. LM-Infektion. 24 h nach Infektion wurden die Organe aus den Ly5.1-Empfängermäusen entnommen, homogenisiert und analysiert. A) Transferierte Tc1⁻ und Tc17-Zellen wurden 24 h nach LM-Infektion durchflusszytometrisch auf IFN- γ , TNF- α und IL-17 untersucht. Das Diagramm zeigt zusammengefasste Werte (in % aller CD8⁺ T-Zellen) aus zwei identisch durchgeführten, unabhängigen Versuchen (jeweils 3-5 Mäuse/Gruppe). Die Symbole stellen Mittelwerte mit Standardfehlern pro Gruppe dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels unpaaren t-Test (zweiseitig). B) Granzyme B-Expression der transferierten OT.1-Zellen mittels Durchflusszytometrie vor (links) sowie 24 h nach LM-Infektion (rechts). Gezeigt sind Daten von zwei zusammengefassten, identisch durchgeführten unabhängigen Experimenten ($n=2-8$ je Gruppe). Die statistische Analyse erfolgte mittels unpaaren t-Tests (einseitig). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Sowohl CTLA-4^{+/+} als auch CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen steigerten nach in-vivo-Restimulation die Granzyme B-Bildung (Abb. 16 B), wobei CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen geringfügig erhöhte Anzahlen an Granzyme B⁺ Zellen aufwiesen ($p=0,0252$; $n=5$). Die Daten verdeutlichten, dass CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen nach Restimulation in-vivo eine höhere Plastizität aufweisen, die mit einer gesteigerten Expression von IFN- γ , TNF- α und Granzyme B verbunden ist.

8.13 CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen in-vitro eine erhöhte Zytotoxizität

Um die CTLA-4-abhängigen, qualitativen Unterschiede der Tc17-Zellen in-vitro zu bestätigen, wurde ein In-vitro-Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt (Abb. 17; Arbeiten und Daten von Aditya Arra [148]). Hierbei wurde die antigenspezifische Zytotoxizität von CTLA-4^{+/+} Tc1-, CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen verglichen. T-Zell-depletierte Splenozyten wurden als Zielzellen mit CFSE gefärbt und mit OVA-I-Peptid beladen. Als Kontrollzellen dienten Splenozyten ohne Antigen-Beladung, die mit niedrigen CFSE-Konzentrationen gefärbt wurden. CFSE^{high} und CFSE^{low} Splenozyten wurden danach 1:1 vermischt und in-vitro-differenzierte Tc1- bzw. Tc17-Zellen hinzugefügt. Die antigenspezifische Lyse der CFSE^{high}-Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand ihrer abnehmenden Nachweisbarkeit gemessen. Tc1-Zellen zeigten die höchste Zell-Lyse (bis zu 60%) und waren Tc17-Zellen überlegen. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen demonstrierten gegenüber CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen eine nahezu verdoppelte, signifikant erhöhte Zytotoxizität (bis zu ca. 40% Zielzell-Lyse; Arbeiten/Daten von Aditya Arra [148]).

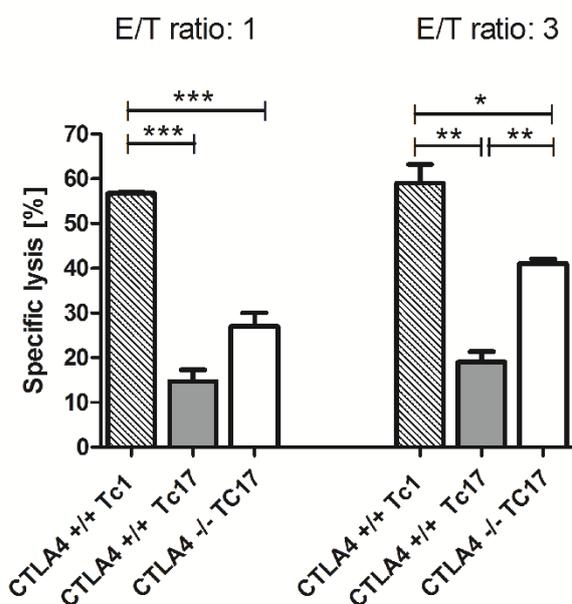


Abbildung 17: Erhöhte In-vitro-Zytotoxizität von CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen

CTLA-4^{+/+} Tc1-, CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen wurden drei Tage stimuliert (s. 7.2.2). T-Zell-depletierte Splenozyten wurden mit 5 μ M (CFSE^{high}) oder 0.25 μ M CFSE (CFSE^{low}) angefärbt. CFSE^{high}-Zellen wurden mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ beladen und als Zielzellen genutzt. CFSE^{high} und CFSE^{low} Splenozyten wurden 1:1 vermischt und danach mit Tc17- oder Tc1-Zellen im Verhältnis 1:1 und 3:1 (E/T ratio; engl.: effector to target cell ratio) für 18h inkubiert. Der Anteil an CFSE^{high}-Zielzellen wurde per FACS bestimmt und im Diagramm als spezifische Lyse im Vergleich zum Ausgangswert in % dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler von jeweils drei Bestimmungen je Gruppe aus einem von zwei unabhängigen, identisch durchgeführten Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen unpaaren t-Test berechnet. $p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. Daten und Versuche von A. Arra [148].

9 Diskussion

CTLA-4 ist ein Molekül, das über zell-extrinsische und -intrinsische Mechanismen T-Zell-Funktionen steuern kann [92],[99],[101]. Es konnte gezeigt werden, dass CTLA-4 nicht nur die T-Zell-Aktivierung, sondern auch selektiv die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen kontrolliert, indem es die Expression des Transkriptionsfaktors Eomes supprimiert und so die Tc1-Differenzierung inhibiert [100]. CTLA-4^{-/-} Tc1-Zellen demonstrierten eine erhöhte IFN- γ - und Granzyme B-Bildung, die mit einer erhöhten Zytotoxizität in-vitro und in-vivo assoziiert war [100]. Da die Rolle von CTLA-4 in Tc17-Zellen noch nicht bekannt war, sollte in dieser Arbeit die Bedeutung von CTLA-4 für die IL-17-Bildung, die Tc17-Differenzierung und -Phänotypstabilität analysiert werden.

9.1 **CTLA-4 verstärkt spezifisch die IL-17-Bildung über einen zell-intrinsischen Mechanismus**

CTLA-4 verstärkte nach Primärstimulation unter Tc17-Bedingungen spezifisch die Bildung von IL-17 in CD8⁺ T-Zellen, nicht jedoch von TNF- α , IL-4 oder IL-10 (Abb. 8-10). Der verstärkende Einfluss von CTLA-4 auf die IL-17-Bildung war erst ab Tag zwei nach Primärstimulation nachweisbar und mit einer zeitgleichen Zunahme der CTLA-4-Expression auf Tc17-Zellen assoziiert (CTLA-4-Expression um ca. das dreifache an Tag drei-vier nach Primärstimulation erhöht; Daten von Aditya Arra [148], nicht gezeigt). Dies legt einen Zusammenhang mit der zunehmenden und ebenfalls an Tag drei-vier nach Primärstimulation maximalen IL-17-Bildung nahe (Abb. 8 B).

In den initialen Tc17-Zellkulturen ohne anti-IL-2/anti-IFN- γ konnte übereinstimmend mit früheren Arbeiten [30],[100],[154] ein minimaler Unterschied in der insgesamt sehr geringen IFN- γ -Bildung von CTLA-4^{-/-} bzw. CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen detektiert werden (Abb. 8 B), der jedoch nach Optimierung der Tc17-Kulturbedingungen (mit anti-IL-2/anti-IFN- γ) in beiden Tc17-Zelltypen weitestgehend supprimiert war (Abb. 11). Unsere Ergebnisse bestätigen frühere Daten [30],[31], dass sowohl IL-2, als auch IFN- γ die Tc17-Differenzierung hemmen und die *absolute* IL-17-Bildung reduzieren (Abb. 10). Jedoch wurden nicht die *relativen Unterschiede* in der IL-17-Bildung von CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen beeinflusst (Abb. 10). Auch bei identischen zellulären und extrazellulären Stimulationsbedingungen der Tc17-Zellen in sog. Ko-Kulturen zeigten CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen eine signifikant erhöhte IL-17-Bildung (Abb. 11). Ein wesentlicher Einfluss anderer T-zell-extrinsischer Mechanismen, wie die Bildung von IL-10 und TGF- β [26] oder der Abbau von CD80/86 auf APZ durch Transendozytose [99] konnte somit ausgeschlossen werden. Demnach war der distinkte CTLA-4-vermittelte Effekt nicht von extrazellulären Faktoren wie Tc1-fördernden Zytokinen oder APZ abhängig, sondern T-Zell-intrinsisch.

Da CTLA-4 unter Tc1-Bedingungen die IFN- γ - und Granzyme B-Bildung zellintrinsisch über eine Suppression von Eomes inhibierte [100] und unter Tc17-Bedingungen die IL-17-Bildung gezielt

verstärkte (Abb. 8-10), sprechen die Daten für eine zentrale Bedeutung CTLA-4s in der milieuhängigen Kontrolle der sich wechselseitig inhibierenden Tc1- bzw. Tc17-Programme.

9.2 Die CTLA-4-vermittelten Unterschiede in der IL-17-Bildung beruhen nicht auf distinkten TZR- oder CD28-Signalen

CTLA-4-kompetente Tc17-Zellen zeigten bei verschiedenen Antigen-Konzentrationen eine konstant erhöhte IL-17-Bildung (Versuche und Daten von Aditya Arra [148],[150], nicht gezeigt). Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Stärke des TZR-Signals die T-Zell-Differenzierung und Effektorfunktionen beeinflussen kann [6],[149],[156]. Während starke TZR-Signale eine Tc1-Differenzierung samt IFN- γ -Bildung fördern [6] und die IL-17-Bildung hemmen, wirken schwache TZR-Signale IL-17-fördernd [157]. Insbesondere dadurch, dass CTLA-4 die Kontaktzeit zwischen APZ und T-Zellen und demzufolge auch die TZR-MHC-Interaktion zeitlich reduzieren kann [95], wäre eine derartige Beeinflussung der Tc17-Differenzierung denkbar gewesen. Es ergaben sich jedoch in unseren Experimenten keine Hinweise darauf, dass unterschiedlich starke TZR-Signale die Unterschiede in der IL-17-Bildung verursachen (Versuche und Daten von Aditya Arra [148],[150]).

Diese Annahme wurde ferner durch ein Experiment mit Antigen/APZ-unabhängiger T-Zell-Aktivierung unterstützt: Auch nach Antikörper-vermittelter T-Zell-Aktivierung (mit anti-CD3/anti-CD28) zeigten diejenigen Tc17-Zellen, die zusätzlich agonistische CTLA-4-Signale erhielten, eine signifikant erhöhte IL-17-Bildung (Versuche und Daten von Aditya Arra [159], nicht gezeigt).

Es ist bekannt, dass neben TZR-Signalen auch die kostimulatorischen Moleküle CD28 und CD80/86 die T-Zell-Differenzierung beeinflussen: Studien in CD4⁺ T-Zellen zeigten eine CD28-vermittelte Unterdrückung der IL-17-Bildung, die IL-2- und IFN- γ -abhängig war [157]. CTLA4-Ig förderte dementsprechend die Th17-Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen, vermutlich durch eine Hemmung der CD28-B7-Interaktion [157]. Im Gegensatz dazu kamen andere Studien zu dem Ergebnis (ebenfalls in CD4⁺ T-Zellen), dass durch CTLA-4-Ig die Bildung von IL-4, IFN- γ und IL-17 in Wildtyp T-Zellen supprimiert werden kann [158]. Hingegen führte CTLA-4-Ig in CD28^{-/-} T-Zellen zu einer verstärkten Bildung von IL-17 (nicht jedoch von IL-4 oder IFN- γ) [158], so dass diese Effekte wahrscheinlich durch eine distinkte Stimulation der CD28/B7-Achse zu erklären sind. Da CTLA-4 die CD28-Expression auf der Zelloberfläche durch verstärkte Internalisierung und Degradierung herunterregulieren kann [94], wäre ein CD28-abhängiger, indirekter Einfluss auf die Tc17-Differenzierung denkbar gewesen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen (Abb. 10) war der CD28-vermittelte Effekt jedoch durch Neutralisierung von IL-2 und IFN- γ vollständig umkehrbar [157], so dass dieser Mechanismus in unserem Modell nicht zutreffend ist.

Im Verlauf konnten weitere Arbeiten demonstrieren, dass anti-CD3-stimulierte Tc17-Zellen mit agonistischen CTLA-4-Signalen mehr IL-17 bilden als ohne CTLA-4-Signal - unabhängig davon, ob sie zusätzlich mit anti-CD28 kostimuliert wurden oder nicht (Daten und Versuche von Aditya Arra [150]). Da die durch CTLA-4 verstärkte IL-17-Bildung somit unabhängig von distinkten TZR- bzw. CD28-Signalen (Daten von Aditya Arra [148],[150]) und zellextrinsischen Faktoren (wie Zytokinen oder B7-Molekülen auf APZ) war (Abb. 10-11), belegen die Ergebnisse eine spezifische Beeinflussung der IL-17-Bildung durch CTLA-4, die T-zellintrinsisch und unabhängig von CD28 vermittelt wird.

9.3 Apoptose- und Proliferationsverhalten beeinflussen nicht die CTLA-4-vermittelte IL-17-Bildung

Unter Tc17-Bedingungen zeigte sich die Expression aktivierungs-induzierter Oberflächenrezeptoren (Abb. 7), von FasL (Abb. 9) und die Proliferationsraten (Abb. 12) in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen nicht wesentlich verändert. CTLA-4 kann über verschiedene Mechanismen den Zellzyklus beeinflussen. So hemmt CTLA-4 in CD4⁺ T-Zellen die Proliferation und verlangsamt den Zellzyklus in der G1-Phase [97]. Ferner ist CTLA-4 in der Lage, den AICD von CD4⁺ Th2-Zellen dadurch zu verhindern, dass bcl-2 verstärkt bzw. Fas/FasL vermindert exprimiert werden [147]. Unsere Ergebnisse stimmen mit früheren Studien in CD8⁺ Tc1-Zellen überein, die nach antigen-spezifischer Stimulation ebenfalls keinen distinkten Einfluss auf die Proliferations- oder Apoptoseraten feststellen konnten [91],[100]. Ein distinktes Proliferations- bzw. Apoptoseverhalten ist deshalb als Ursache der unterschiedlichen IL-17-Bildung in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen unwahrscheinlich. Aufgrund der Daten ist es möglich, dass CTLA-4 in CD4⁺ T-Zellen einen stärkeren Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung sowie Proliferations- und Apoptose-Mechanismen ausübt. Dazu passt ebenfalls, dass die lymphoproliferative Erkrankung in CTLA-4^{-/-} Mäusen primär CD4⁺ T-Zell-vermittelt ist, während CD8⁺ T-Zellen weitestgehend naive Phänotypen behielten [90].

9.4 CTLA-4 induziert die Expression zentraler Tc17-Faktoren in Tc17-Zellen

In angereicherten IL-17⁺ CTLA-4-kompetenten Tc17-Zellen konnte eine erhöhte Expression der zentralen Tc17-Transkriptionsfaktoren RORc und RORα sowie IL-17a/f nachgewiesen werden (Abb. 13; Daten von Aditya Arra [148]). Des Weiteren war die mRNA Tc17-fördernder Faktoren wie IL-21, IRF-4 oder IL-23R erhöht nachweisbar, was als Korrelat für einen höheren Differenzierungsgrad CTLA-4-kompetenter Tc17-Zellen gesehen werden kann. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigten ab drei Tagen nach Stimulation eine Verminderung der mRNA von RORc sowie Tc17-fördernder Faktoren wie IRF-4, IL-21 und IL-23R. Parallel dazu deutete sich zu späteren Zeitpunkten eine ansteigende Expression des Tc1-Transkriptionsfaktor Eomes in CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen an (Abb. 13; Versuche und Daten von Aditya Arra [148]). Es ist bekannt, dass Eomes/T-Bet-defiziente CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung spontan IL-17

bilden [73], was für eine Unterdrückung des Tc17-Programmes durch ein dominantes Tc1-Programm spricht. Die hier vorliegenden Daten könnten daher im Sinne einer initialen CTLA-4-vermittelten Unterdrückung des Tc1-Programmes gedeutet werden, die im weiteren zeitlichen Verlauf nachlässt und eine Desinhibition des Tc17-Programmes erlaubt [73],[100]. Die niedrig-konstante T-Bet mRNA könnte als aktivierungs-induziert gedeutet werden, da die T-Bet-Expression - im Gegensatz zu Eomes - rasch nach TZR-Stimulation in aktivierten CD8⁺ T-Zellen zunimmt [159]. Entsprechend früherer Ergebnisse in Tc1-Zellen [100] konnte in Tc17-Zellen ebenfalls kein distinkter Einfluss von CTLA-4 auf T-Bet gesehen werden (Abb. 13 A, B), so dass Eomes vermutlich eine entscheidende Rolle in der CTLA-4-vermittelten Kontrolle der Tc1- und Tc17-Programme zukommt. IL-21, das in CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen verlängert exprimiert wurde (Abb. 13), trägt hierbei möglicherweise über eine Suppression von Eomes zur Förderung und Aufrechterhaltung der Tc17-Differenzierung bei [71].

IRF-4 wird möglicherweise durch CTLA-4-Signale oder IL-21-vermittelt [32] stabilisiert (Abb. 13) und könnte als wesentlicher Tc17-fördernder Transkriptionsfaktor zu einer Aufrechterhaltung der RORc- und IL-23R-Transkription führen [32],[71]. Es ist bekannt, dass IRF-4 sehr früh (innerhalb von 24 h) nach T-Zell-Aktivierung abhängig von der Stärke des TZR-Signal exprimiert wird und für die T-Bet-Expression in Tc1-Zellen bedeutend ist [160]. Da T-Bet jedoch in beiden Tc17-Gruppen ähnlich niedrig exprimiert war, IRF-4 deutlich höher in Tc17- als in Tc1-Zellen und vor allem zu späteren Zeitpunkten (ab Tag drei) verstärkt in CTL-4^{+/+} Tc17-Zellen nachweisbar war, deuten die vorliegenden Daten auf eine Tc17-fördernde Funktion IRF-4s hin.

Runx-1 mRNA war ab Tag drei in CTL-4^{+/+} Tc17-Zellen verstärkt nachweisbar. Auch Runx-1 ist in der Lage, die Differenzierung IL-17-bildender T-Zellen durch eine erhöhte Transkription von RORc zu fördern [80] und könnte dementsprechend die Transkription von RORc und IL-17-fördernder Zielgene unterstützen. T-Bet ist durch eine direkte Interaktion mit Runx-1 in der Lage, die Runx-1-vermittelte Transkription von RORc zu inhibieren [82]. Jedoch kommt diesem Mechanismus in unseren Versuchen wahrscheinlich keine Bedeutung zu, da T-Bet mRNA und Protein in CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen nur sehr niedrig nachweisbar waren (Abb. 13 A, B).

SOCS3 mRNA unterschied sich nicht signifikant in den Tc17-Zellen (Abb. 13). Da SOCS3 die STAT-3-Phosphorylierung reduziert, negativ auf die IL-23-vermittelte Th17-Stabilisierung wirkt [85],[86] und die Konversion von Tc17-Zellen zu IL-17⁺/IFN- γ ⁺ Zellen fördert [66], wäre eine erhöhte SOCS3-Expression in CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen denkbar gewesen. Des Weiteren kann SOCS3 an CTLA-4 binden und sowohl in naiven, als auch in aktivierten CD4⁺ T-Zellen die CTLA-4-Expression reduzieren [161]. Unsere Daten erbrachten jedoch übereinstimmend mit früheren Ergebnissen über die IRF-4-

abhängige Regulation von IL-17 [32] keine Hinweise darauf, dass der CTLA-4 vermittelte Mechanismus abhängig von SOCS3 ist (Abb. 13). Die Bedeutung der leicht erhöhten SOCS3-mRNA in CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen ist in diesem Zusammenhang nicht eindeutig zu klären, stimmt aber mit früheren Beobachtungen in Th17-Zellen überein [162]. Interessanterweise konnte in humanen T-Zellen gezeigt werden, dass SOCS3 auch die IL-17-Bildung induzieren kann und war dementsprechend verstärkt in Th17-Zellen nachweisbar [162]. Durch eine experimentelle Inhibierung von SOCS3 könnte zukünftig untersucht werden, ob eine CTLA-4-vermittelte Bedeutung von SOCS3 für die Tc17-Differenzierung vorliegt.

SOCS1 war sowohl in Tc1- als auch Tc17-Zellen nachweisbar (Abb. 13). In CD4⁺ T-Zellen zeigte SOCS1 eine IL-17-fördernde Wirkung, indem antagonistische, STAT-1-vermittelte Effekte von IFN- γ auf die STAT-3-IL-17-Achse reduziert wurden [87]. Demzufolge könnte dies in CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen zu einer Tc17-Stabilisierung beitragen. Interessanterweise ist SOCS1 auch in Tc1-Zellen nachweisbar (Abb. 13), möglicherweise im Sinne einer beginnenden negativen Rückkopplung des Tc1-Programmes.

Weiterhin konnte kein signifikanter Einfluss von CTLA-4 auf AHR mRNA nachgewiesen werden, der als Liganden-aktivierbarer Transkriptionsfaktor positiven Einfluss auf die Th17-Differenzierung und ihre Funktion in-vivo nehmen kann [163],[164]. In Tc17-Zellen könnte jedoch AHR generell eine geringere Bedeutung als in Th17-Zellen zukommen [165]. Die Foxp3-Expression blieb in CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen unverändert niedrig (Abb. 9 A). In regulatorischen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass auf transkriptioneller Ebene eine enge Wechselwirkung zwischen Foxp3 und ROR γ t besteht, wobei Foxp3 durch direkte Interaktion mit ROR γ t die IL-17-Bildung reduzieren kann [80],[166]. In unseren Versuchen ergaben sich in CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen jedoch keine Hinweise auf eine Desinhibition der Foxp3-Expression, so dass dieser Mechanismus nicht die distinkte IL-17-Bildung der Tc17-Zellen erklären kann.

9.5 CTLA-4 bewirkt einen höheren Differenzierungsgrad in Tc17-Zellen

CTLA-4 erhöhte nicht nur die Anzahlen an IL-17-Produzenten (Abb. 10 B), sondern steigerte auch die IL-17-Produktion pro Tc17-Zelle, wodurch die IL-17-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen von CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen um ein Vielfaches erhöht waren (Abb. 8 A, 10 A, Daten von Aditya Arra [148]). In CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen zeigte sich insgesamt eine erhöhte und prolongierte Nachweisbarkeit von mRNA zentraler Faktoren des Tc17-Programmes (Abb. 13 A) sowie durchflusszytometrisch eine erhöhte MFI von ROR γ t (Abb. 13 B). Diese Daten deuten darauf hin, dass CTLA-4 nicht nur die Quantität der IL-17-Produzenten erhöht, sondern auch eine höhere Tc17-Differenzierung ermöglicht.

CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen wiesen Ähnlichkeiten zu IRF-4-defizienten T-Zellen auf, die ebenfalls durch eine intrinsische Verminderung von IL-17, IL-23R und RORc mRNA charakterisiert sind [32],[72]. Die STAT-3-Aktivierung und SOCS3-Expression war in IRF4^{-/-} Th17-Zellen unbeeinträchtigt. Im Gegensatz zu unseren CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigten IRF-4^{-/-} Th17-Zellen jedoch eine stark erhöhte Foxp3-Expression, die den IRF-4-defizienten Phänotyp erklären könnte [32]. Durch eine retrovirale Überexpression von IRF-4 konnte in unseren CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen die IL-17-Bildung nicht vollständig wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt, Versuche und Daten von Aditya Arra [148]). Obwohl RORγt-Protein in CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen verstärkt nachweisbar war (Abb. 13 B), konnte auch durch eine retrovirale Überexpression von RORc in CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen der Tc17-Phänotyp nicht vollständig wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt, Versuche und Daten von Aditya Arra [148]). Diese Daten zeigen, dass die CTLA-4-vermittelte Tc-17-Differenzierung nicht durch eine alleinige RORγt- oder IRF-4-Induktion erklärt werden kann. Wie genau die Tc17-Transkriptionsfaktoren RORc und IRF-4 durch CTLA-4 induziert werden, bleibt in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt.

Auch STAT-3-defiziente T-Zellen weisen phänotypische Ähnlichkeiten zu CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen auf [33]. Es ist bekannt, dass STAT-3^{-/-} Tc17-Zellen eine mit Tc1-Zellen vergleichbare Genexpression aufweisen, die durch eine erhöhte Eomes-/IFN-γ-Expression und verminderte RORγt-/IL-17-Expression gekennzeichnet ist [79]. Interessanterweise konnte in diesen STAT-3^{-/-} Tc17-Zellen durch retrovirale Überexpression von RORγt ebenfalls keine vollständige IL-17-Bildung wiederhergestellt werden [79]. Dies zeigt, dass es wahrscheinlich mehrere Mechanismen der Tc1-Supprimierung gibt, die sowohl STAT-3-abhängig (über Interaktionen mit STAT-1/STAT-5), als auch RORγt-vermittelt sind (durch eine funktionelle Hemmung von T-Bet-/Eomes-Funktionen [79]). Es ist daher möglich, dass CTLA-4 über beide Mechanismen (auf Ebene der STAT-Moleküle sowie der Transkriptionsfaktoren) Einfluss auf die Tc1- bzw. Tc17-Differenzierung nehmen kann [100],[150].

Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass CTLA-4 in Tc17-Zellen die STAT-3-Aktivierung erhöht und die Bindung von STAT-3 an Promotorregionen des IL-17-Gens fördert [150]. Dies führte zu einer erhöhten Expression von IL-17 und anderen STAT-3-abhängigen-Faktoren des Tc17-Programmes wie IL-21, IL-23R und RORγt [150] und könnte die hier vorgestellten Ergebnisse erklären. CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen zeigten hingegen eine zunehmende STAT-1-Aktivierung sowie eine Reduzierung des p-STAT-3/p-STAT-1-Verhältnisses, was Tc1-Signalkaskaden förderte [150]. Ferner ließ sich eine erhöhte Bindung von STAT-5 an IL-17-Promotoren feststellen [150], welches dort mit STAT-3 um Bindestellen konkurriert [23],[81] und die IL-17-Expression hemmt. Durch eine chemische STAT-3-Inhibierung konnte die erhöhte IL-17-Bildung von CTLA-4-kompetenten Tc17-Zellen

aufgehoben werden [150]. Diese Daten verdeutlichen, dass der fördernde Effekt von CTLA-4 auf die Tc17-Differenzierung im Wesentlichen STAT-3-abhängig ist [150]. Wie CTLA-4 mechanistisch die Phosphorylierung von STAT-3 bzw. STAT-1 kontrolliert, ist bisher nicht abschließend geklärt. Es ergaben sich hierbei keine Hinweise auf eine direkte Bindung der STAT-1- bzw. STAT-3-Moleküle an die zytoplasmatischen Anteile CTLA-4s [150]. Ob eine indirekte Hemmung der STAT-1-Phosphorylierung durch an CTLA-4 gebundene Phosphatasen stattfindet, ist bisher nicht abschließend untersucht [150].

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass CTLA-4 die Zytokin-abhängige STAT-3-/STAT-1-Signaltransduktion kontrolliert, und somit richtungsweisend für die weitere T-Zelldifferenzierung ist (speziell der Tc17- und Tc1-Programme). Daher könnte CTLA-4 - neben der bereits bekannten Bedeutung für die Kostimulation (als sog. „zweites“ Signal der T-Zell-Aktivierung) - möglicherweise auch eine bedeutende Rolle für das „dritte“, Zytokin-abhängige Signal der T-Zellaktivierung zukommen [2],[3]. Es ist bekannt, dass dieses „dritte Signal“ bei CD8⁺ T-Zellen v.a. durch die Zytokine IL-12 sowie IL-21 vermittelt wird sowie ein fließender Übergang zur T-Zelldifferenzierung besteht [2],[3]. Die Fähigkeit von IL-21, Eomes und die IFN- γ -Bildung zu hemmen [71], die IL-17-Bildung IRF-4-abhängig zu fördern [72], und die STAT-3/STAT-1-Phosphorylierung zu beeinflussen [167], zeigt Ähnlichkeiten zu den hier beschriebenen CTLA-4-vermittelten Effekten. Daher könnte in zukünftigen Versuchen die Möglichkeit einer CTLA-4-vermittelten, distinkten Reaktionsfähigkeit auf Zytokine wie IL-21, IL-23 sowie IL-12 bzw. ihre Signalweiterleitung über die JAK/STAT-Signalwege näher untersucht werden.

9.6 CTLA-4-Signale stabilisieren den IL-17⁺ Tc17-Phänotyp nach Restimulation in-vitro

Nach in-vitro Restimulation unter Tc1-Bedingungen zeigte sich eine erhöhte Phänotyp-Stabilität CTLA-4-kompetenter Tc17-Zellen, während CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen verstärkt zu einem Tc1-ähnlichen Phänotyp konvertierten (Abb. 14, 16). Frühere Arbeiten erbrachten Hinweise darauf, dass die Phänotyp-Stabilität IL-17-bildender T-Zellen durch ihren Differenzierungsgrad bestimmt wird. So zeigten „endgradig differenzierte“ Th17-Zellen eine geringere Anfälligkeit für eine Konversion zum Th1-Phänotyp [8]. Auch für Tc17-Zellen wurde eine erhöhte Phänotyp-Stabilität mit zunehmender Differenzierung beschrieben [63]. Die erhöhte Resistenz der CTLA-4-kompetenten Tc17-Zellen gegenüber einer Konversion in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp (Abb. 16) sprechen deshalb für einen höheren, CTLA-4-vermittelten Tc17-Differenzierungsgrad. Dies wird wahrscheinlich über die verstärkt exprimierten Tc17-Faktoren in CTLA-4-kompetenten Tc17-Zellen vermittelt (Abb. 13). Insbesondere die verlängerte IL-21- und IL-23R-Expression ist in diesem Zusammenhang interessant (Abb. 13 A), da eine gesteigerte IL-23R-Expression mit einer erhöhten Stabilität des IL-17-bildenden T-Zell-Phänotyps assoziiert ist und daher für den CTLA-4-vermittelten Effekt von Bedeutung sein kann [77],[168],[169].

Im Verlauf konnte demonstriert werden, dass CTLA-4-defiziente Tc17-Zellen, die unter Tc1-Bedingungen restimuliert wurden, eine erhöhte Aktivierung des Tc1-fördernden (und Tc17-inhibierenden) STAT-1 sowie eine erhöhte Bindung von STAT-5 an IL-17-Promotoren aufweisen [150]. In der Folge wurden STAT-3-abhängige, Tc17-aufrechterhaltende Faktoren wie IL-17 und IL-23R supprimiert [150], was den Verlust des klassischen Tc17-Phänotyps erklären kann. Dies geschieht übereinstimmend mit den hier vorgelegten Ergebnissen (Abb. 14, 16) zugunsten einer gesteigerten Plastizität der CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen, die verstärkt in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp mit IFN- γ /TNF- α -Expression konvertieren. Vergleichbar mit den vorgelegten Daten (Abb. 13) blieb die T-Bet-Expression ebenfalls unverändert [150]. Vermutlich beruht die Konversion daher primär auf einer erhöhten Eomes-Expression in CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen, die aus einer verminderten STAT-3-abhängigen Tc1-Suppression resultiert [79]. Dementsprechend wurde in T-Bet-defizienten Th17-Zellen, die in einen IFN- γ -bildenden Phänotyp konvertierten, ebenfalls eine Eomes-abhängige Kontrolle der Konversion vermutet [170]. Über welche Mechanismen CTLA-4 in plastischen Tc17-Zellen die Eomes-Expression steuert, ist nicht abschließend geklärt. Vermutlich stellt jedoch das p-STAT-3/p-STAT-1-Verhältnis einen wichtigen Mechanismus dar, über den CTLA-4 die Tc17-Plastizität dynamisch reguliert, da die Eomes-Expression v.a. STAT-1-abhängig erfolgt [171].

Weitere Daten zeigen, dass STAT-3 auch epigenetische Histon-Modifikationen bedingen kann, die eine Expression von RORc begünstigen und so zur Stabilität des Th17-Phänotyps beitragen [172]. Ob CTLA-4 als Folge der erhöhten Aktivierung des STAT-3-Signalweges Einfluss auf epigenetische Modifikationen der Tc17-Gene nehmen kann und so den Tc17-Phänotyp stabilisiert, ist unbekannt.

9.7 CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen eine mit Tc1-Zellen vergleichbare Zytotoxizität gegen *Listeria monocytogenes*

Die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen LM ist zu großen Anteilen von Tc1-Faktoren wie IFN- γ , TNF- α und Granzyme B abhängig [151],[152] und wurde daher als Maß für die Plastizität von Tc17-Zellen genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen die LM-CFU nur geringfügig reduzieren (Abb. 15 B) und in-vivo eine reduzierte Zytotoxizität gegen LM aufweisen. Dies stimmt mit Daten überein, die ein vermindertes zytotoxisches Potential von Tc17-Zellen in-vitro und in-vivo beschrieben [19],[30],[31]. Im Gegensatz dazu zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine deutlich effizientere LM-Immunität, die mit Tc1-Zellen (als Positivkontrolle genutzt) vergleichbar war (Abb. 15 B). Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass die Gabe von anti-CTLA-4 die LM-Abwehr steigert [152],[155]. Dieser Effekt war mit einer Expansion von in-vivo differenzierten CD8⁺ T-Gedächtniszellen assoziiert, die verstärkt die für die LM-Immunität zentralen Zytokine IFN- γ /TNF- α bildeten [155]. Unsere Ergebnisse mit in-vitro differenzierten Tc17-Zellen bestätigten demnach, dass CTLA-4-Signale die LM-Immunität hemmen [152],[155].

9.8 CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen zeigen aufgrund gesteigerter Plastizität einen zytotoxischen Phänotyp

Übereinstimmend mit der in-vitro Restimulation (Abb. 14) zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine deutlich höhere Plastizität mit gesteigerter IFN- γ /TNF- α^{high} -Koproduktion (Abb. 16 A), die auch in Tc1/Th1-Zellen nach CTLA-4-Blockade in anderen LM-Infektions-Versuchen vermehrt nachweisbar war [155]. Diese Doppelproduzenten wurden als multifunktionale Zellen mit starker In-vivo-Funktionalität beschrieben und korrelieren gut mit einer erhöhten Immunität gegen LM und andere Infektionen [145],[155], so dass sie wahrscheinlich auch in diesem Fall für die verstärkte, Tc1-ähnliche LM-Abwehr verantwortlich sind. Auch in anderen Autoimmun- [31] und Tumormodellen [56],[123] beruhte die In-vivo-Funktionalität von Tc17-Zellen im Wesentlichen auf diesen transformierten, polyfunktionalen IFN- γ^+ /TNF- α^+ T-Zellen.

Im Gegensatz dazu zeigten CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen geringere Anzahlen von IFN- γ /TNF- α^{high} -Produzenten, jedoch vermehrt IL-17/IFN- γ -Doppelproduzenten, was mit einer geringen LM-Immunität assoziiert war (Abb. 15 B). Diese IL-17⁺/IFN- γ^+ CD8⁺ T-Zellen konnten in früheren Studien ebenfalls im Rahmen von LM-Infektionen erhöht nachgewiesen werden, waren IL-23-abhängig und konnten durch typische Tc1-Zytokine supprimiert werden [168]. Demzufolge stellen sie möglicherweise Übergangsformen zwischen Tc17- und Tc1-Zellen dar. In anderen Versuchen waren diese IL-17/IFN- γ -Doppelproduzenten zwar mit einer moderaten Anti-Tumor-Immunität assoziiert [69], wurden jedoch durch Hinzugabe von rekombinantem IL-12 induziert und so möglicherweise in ihrer Zytotoxizität beeinflusst. In zukünftigen Versuchen könnte über längere Zeiträume nach In-vivo-Transfer der Anteil der IL-17/IFN- γ -bzw. IFN- γ /TNF- α^{high} -Produzenten von CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen verglichen werden. So könnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden, zu welchem Ausmaß und über welche Zeiträume CTLA-4-kompetente Tc17-Zellen in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp mit gesteigerter Zytotoxizität übergehen können. Die Bedeutung von IFN- γ und IL-17 für die Tc17-Immunantwort gegen LM könnte bestätigt werden, indem durch Hinzugabe von anti-IFN- γ bzw. anti-IL-17 eine Aufhebung der LM-Immunität von CTLA-4^{+/+} bzw. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen geprüft wird.

Die bei Tc1-Zellen paradox erscheinende Diskrepanz zwischen geringster detektierbarer Zellzahl (Abb. 15 C) und höchster LM-Immunität (Abb. 15 B) wurde mehrfach beschrieben [31],[154],[173]. Dies legt nahe, dass Tc1-Zellen das größte zytotoxische Potential pro Zelle haben. Eine Ursache könnte in verschiedenen zytotoxischen Mechanismen der LM-Immunität im Vergleich zu Tc17-Zellen liegen [65]. So zeigte sich in Tc1-Zellen eine hohe Granzyme B-Expression (Abb. 16 B). Es ist bekannt, dass sowohl die IL-17-, als auch die IFN- γ -bildenden Tc17-Subpopulationen nach Primärstimulation kaum Granzyme-B exprimieren [19],[31].

Interessanterweise regulierten CTLA-4^{-/-} bzw. CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen nach LM-Restimulation die Granzyme-B-Expression stark hoch (Abb. 16 B). Die geringfügig höhere Granzyme-B-Expression in CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen könnte ebenfalls zu einer verstärkten LM-Abwehr beitragen. Eine mögliche Ursache für die differentielle Expression von Granzyme B könnte die distinkte Wirkung von IL-23 über den in CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen verstärkt exprimierten IL-23R sein [168].

In späteren Arbeiten konnte ferner gezeigt werden, dass CD107 α (ein Marker für zytotoxische Degranulation in CD8⁺ T-Zellen, der höher auf Tc1- als auf Tc17-Zellen exprimiert wird [65]) auf CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen erhöht nachweisbar ist und die erhöhte, Tc1-ähnliche Zytotoxizität widerspiegelt [150]. Nach chemischer STAT-3-Inhibierung konnte eine deutliche Erhöhung der CD107 α -Expression in Tc17-Zellen nachgewiesen werden [150]. Dies spricht für eine STAT-3-abhängige Kontrolle der Zytotoxizität in Tc17-Zellen, die durch CTLA-4 beeinflusst werden kann. Nach STAT-3-Inhibierung kommt es dabei zu einem Übergewicht an STAT-1/-5-Aktivierung [150], was vermutlich über eine erhöhte Eomes-Expression (Abb. 13) eine Tc1-ähnliche Zytotoxizität vermittelt.

9.9 Plastische CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen sind keine konventionellen Tc1-Zellen

CTLA-4^{-/-} und CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen zeigten ähnliche, im Vergleich zu Tc1-Zellen erhöhte Persistenzraten im Gewebe (Abb. 15 C). Eine rein quantitative Ursache durch erhöhte Zellzahlen am Infektionsort (durch unterschiedliches Überlebens-/Apoptose- [97],[147] oder Migrationsverhalten [174]) ist daher als Ursache für die distinkte LM-Immunität der CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen unwahrscheinlich. Die ähnlichen Anzahlen detektierbarer Tc17-Zellen bestätigen die Vermutung, dass CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine effektivere LM-Immunität aufgrund einer höheren zell-intrinsischen Zytotoxizität vermitteln, die durch erhöhte IFN- γ /TNF- α^{high} - und Granzyme B-Expression charakterisiert ist. Genauere Mechanismen, über die die LM-Immunität vermittelt wird (direkte bakteriolytische bzw. zytotoxische Wirkung auf infizierte Zellen oder eine indirekte Wirkung über Rekrutierung anderer Immunzellen [39],[57],[65]) könnten im Vergleich zu Tc1-Zellen zukünftig untersucht werden.

Trotz ihres Tc1-ähnlichen Phänotyps weisen die plastischen CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen weiterhin Tc17-typische Eigenschaften wie erhöhte Persistenzraten auf (Abb. 15 C). Dies stimmt mit früheren Erkenntnissen aus mehreren murinen Infektions- und Tumormodellen überein: Konvertierte Tc17-Zellen, die einen Tc1-ähnlichen, polyfunktionalen IFN- γ^+ /TNF- α^{high} Phänotyp aufwiesen, zeigten im Vergleich zu Tc1-Zellen weiterhin höhere Persistenzraten, die für Tc17-Zellen charakteristisch sind [56],[65],[154]. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass kein klassischer Tc1-Phänotyp nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip entstanden ist, sondern noch ein partielles Tc17-Programm in den konvertierten Tc17-Zellen vorhanden ist.

9.10 Unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber Zytokinen als bestimmender Faktor für die Plastizität

Es ist bisher nicht geklärt, ob IL-17⁺/IFN- γ ⁺ Tc17-Zellen eine Zwischenstufe zwischen ehemals reinen, IFN- γ ⁻ IL-17-Produzenten und „final“ konvertierten IL-17⁺/IFN- γ ⁺/TNF- α ^{high} Tc17-Zellen darstellen und ob dieser dynamische Übergang in CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen verstärkt ist. Daten aus einem murinen IL-17a-Reporter-gen-Modell legen nahe, dass die IL-17⁺/IFN- γ ⁺ Th17-Zellen aus „reinen“ IL-17⁺ Zellpopulationen stammen, die abhängig vom Mikromilieu im Laufe der Immunantwort konvertieren [175]. Es ist bekannt, dass IL-23 den Tc17-Phänotyp stabilisiert sowie die Generierung eines IL-17⁺/IFN- γ ⁺-Phänotyps aus naiven CD8⁺ T-Zellen verstärkt [168], während IL-12 die Konversion von Tc17-Zellen in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp fördert [66],[69],[176]. In einem autoimmunen Colitis-Modell konnte durch IL-23 jedoch auch eine IFN- γ -Bildung in IL-17⁺ Th17-Zellen induziert werden [170],[177], so dass IL-23 abhängig von den jeweiligen Stimulationsbedingungen wahrscheinlich verschiedene Funktionen erfüllen kann. Die Konversion von ehemaligen IL-17-Monoproduzenten in IL-17⁺/IFN- γ ⁺ Tc17-Zellen könnte demzufolge durch eine unterschiedliche Suszeptibilität der CTLA-4^{-/-} bzw. CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen auf Zytokine wie IL-23 [168], IL-21, IL-12 [69] oder IL-1 [36] beruhen. Ob das CTLA-4-abhängige p-STAT-3/p-STAT-1-Verhältnis [150] auf einer unterschiedlichen Rezeptor-Expression von IL-12R, IL-21R oder IL-23R (Abb. 13) oder distinkter intrazellulärer Signaltransduktion beruht, wird in dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet.

Interessanterweise verfügen die antagonistisch wirkenden Zytokine IL-23 und IL-12 - genau wie ihre Rezeptoren - über jeweils eine identische Kette (p40 bzw. IL-12R β 1 Kette) [168]. Einige Daten sprechen dafür, dass IL-23 über den IL-12R ebenfalls Einfluss auf IL-12-vermittelte Signale nehmen kann [70], was die dynamische Verflechtung der Tc1-/Tc17-Programme und mögliche Einflussmöglichkeiten CTLA-4s zeigt. Weitere Studien mit IL-23R^{-/-}, IL-12p40^{-/-} (defizient in IL-12- und IL-23-Bildung) sowie IL-12p35^{-/-} T-Zellen (nur defizient in IL-12-Bildung) könnten hilfreich sein [170], um die CTLA-4-vermittelten Mechanismen auf die Signaltransduktion und erhöhte STAT-3-Phosphorylierung näher zu untersuchen. Auch monoklonale Antikörper gegen p40, die sowohl IL-12, als auch IL-23 neutralisieren und bei der Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen geprüft wurden [178], wären ein Ansatzpunkt, um den Einfluss von CTLA-4 auf die IL-17-Bildung weiter zu analysieren.

9.11 Langzeit-Immunität und Gedächtniszellbildung

Die Bedingungen, unter denen die T-Zellaktivierung und -differenzierung initial stattfinden (wie TZR-Stimulation, Kostimulation mittels CTLA-4/CD28, beteiligte Transkriptionsfaktoren [11] und das vorherrschende Zytokin-Mikromilieu [16]), beeinflussen die T-Gedächtniszellentstehung [13]. In der

hier durchgeführten Studie unterschied sich die Expression von IL-7R und KLRG-1 in CTLA-4^{-/-} bzw. CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen nicht signifikant (Abb. 15 D; detektierbare Frequenzen der Tc1-Zellen zu gering).

Nach anti-CTLA-4/anti-PD-1-Therapie konnte in tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen eine erhöhte Expression des IL-7R nachgewiesen werden [179]. Aus murinen Melanom-Modellen ist bekannt, dass Tc17-Zellen nach adoptivem Transfer in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp konvertierten und einen IL-7R^{high}/KLRG-1^{low} Phänotyp zeigten. Diese T-Zellen waren nach 32 Tagen dreifach erhöht in-vivo nachweisbar (im Vergleich zu Tc1-Zellen) und mit einer effizienten Tumorregression assoziiert [56]. Im Gegensatz dazu demonstrierten klassische Tc1-Zellen erhöhte Anzahlen an SLEC-artigen, IL-7R^{low}/KLRG-1^{high} T-Zellen, die nach Transfer in deutlich niedrigeren Zahlen nachweisbar und mit Tumorprogression assoziiert waren [56],[65]. Dies könnte darauf hinweisen, dass unter Tc17-Zellen erhöhte Anzahlen an langlebigen Gedächtniszellen vorlagen, die eine verstärkte homöostatische Proliferation aufweisen [180] und so ein größeres „Reservoir“ an Tc1-ähnliche T-Zellen über längere Zeiträume bereitstellen können [180]. In CD4⁺ T-Zellen förderte CTLA-4 ebenfalls die Ausbildung eines effizienten T-Gedächtniszellpools [181]. Im kurzen Zeitraum des In-vivo-Experiments war jedoch keine CTLA-4-vermittelte Beeinflussung des Gedächtniszellen- (IL-7R^{high} /KLRG-1^{low}) oder Effektorzellen- (IL-7R^{low}/KLRG-1^{high}) Anteils nachweisbar (Abb. 15 D).

Starke T-Bet-Signale sind für die Ausbildung von IL-7R^{low}/KLRG-1^{high} T-Effektorzellen notwendig, während eine moderate T-Bet-Expression mit der Ausbildung von IL-7R^{high} /KLRG-1^{low} Gedächtniszell-Vorstufen assoziiert ist [11]. Ein distinkter CTLA-4-vermittelter Einfluss auf T-Bet ist in unseren Versuchen unwahrscheinlich, da sich - ähnlich wie in Tc1-Zellen [100] - kein signifikanter Unterschied in der CTLA-4-abhängigen T-Bet-Expression zeigte (Abb. 13 A, B). Eomes-defiziente CD8⁺ T-Gedächtniszellen demonstrierten eine gestörte homöostatische Proliferation und wiesen demzufolge eine verminderte Langzeit-Persistenz auf [17]. Die erhöhte Eomes-Expression in unseren CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (Abb. 13 A) könnte demzufolge eine verbesserte Langzeit-Immunität bedingen, da der Anteil langlebiger CD8⁺ T-Gedächtniszellen erhöht werden könnte. In früheren Arbeiten ließ sich dementsprechend durch das serologische Blocken von CTLA-4 während der Primärstimulation eine langfristig gesteigerte Expansion und Funktion von CD8⁺ T-Gedächtniszellen induzieren [155],[182]. Während der Sekundärantwort von T-Gedächtniszellen bewirkte anti-CTLA-4 eine gesteigerte Effektivität durch eine verstärkte Expansion und Zytokinbildung der T-Zellen [155]. Eine Analyse der Eomes-Expression erfolgte in diesem Zusammenhang nicht. In Anbetracht der chronischen LM-Infektion kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Effekt von anti-CTLA-4 vielmehr auf einer Aufhebung der CD8⁺ T-Zell-Erschöpfung beruht [131], als auf einer Beeinflussung des Gedächtniszellpools [155].

9.12 Mögliche Implikationen für die CTLA-4-Blockade in der Tumorthherapie

Das Vorkommen von IL-17-bildenden T-Zellen im Tumormikromilieu ist ein vielfach beschriebenes Phänomen [183],[184]. Während einige Arbeiten eine anti-tumoröse Wirkung von IL-17 bzw. der sezernierenden T-Zellen zeigten [52],[53], gehen die meisten Arbeiten von einem tumor-fördernden Effekt über verschiedene Mechanismen aus [185]. Die Zytokine IFN- γ und TNF- α , die unter anderem von tumorinfiltrierenden Tc1- und Th1-Zellen sezerniert werden, sind für die Tumorregression von entscheidender Bedeutung [122],[186]. Neben des direkten Einflusses von IFN- γ /TNF- α auf Tumorzellen (die u.a. zu einem Zellzyklus-Arrest der Tumorzelle führen [122]) sind auch indirekte Mechanismen beteiligt, wie die chemotaktische Rekrutierung anderer Abwehrzellen [57].

Unsere Daten legen nahe, dass die erhöhte LM-Immunität und Zytotoxizität der CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen durch eine qualitativ distinkte Expression von Effektormolekülen wie IFN- γ /TNF- α und Granzyme B bedingt ist, die aus einer verminderten Stabilität des Tc17-Phänotyps resultiert (Abb. 14, 16). Klinische Daten zeigten bereits, dass tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen die IFN- γ /TNF- α -Koexpression nach anti-CTLA-4-Behandlung steigern [113],[118],[187]. Übereinstimmend mit diesen Daten ist aus experimentellen Studien bekannt, dass mittels CRISPR/Cas9-Knock-out von CTLA-4 in aktivierten CD8⁺ T-Zellen eine erhöhte Tumorimmunität erzeugt werden konnte, die durch eine erhöhte Bildung von IFN- γ /TNF- α gekennzeichnet war [188]. Auch in früheren Tumormodellen konnte nach anti-CTLA-4-Gabe eine gesteigerte Koexpression von IFN- γ , TNF- α und Granzyme B in tumorantigen-spezifischen T-Zellen detektiert werden [123]. Hierbei lässt sich jedoch nicht abschließend beantworten, ob diese posttherapeutisch nachweisbaren IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ T-Zellen aus ursprünglichen Tc17- oder Tc1-Zellen stammen [100].

Überträgt man die hier vorgelegten Ergebnisse auf die Tumorimmunologie, ist es wahrscheinlich, dass nicht-zytotoxische Tc17-Zellen im Tumor-Mikromilieu durch anti-CTLA-4 verstärkt in einen Tc1-ähnlichen, zytotoxischen Phänotyp mit erhöhter Koexpression von IFN- γ /TNF- α und Granzyme B konvertieren (Abb. 18) und dadurch eine verbesserte Anti-Tumor-Immunität vermitteln. Nachdem bereits eine erhöhte Zytotoxizität der CTLA-4-defizienten Tc17-Zellen in-vitro demonstriert wurde (Abb. 17, Versuche und Daten von Aditya Arra [148]), konnte im Verlauf durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen auch in-vivo eine gesteigerte Anti-Tumor-Immunität besitzen (Versuche und Daten von Aditya Arra; [150]): In einem murinen Tumormodell zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine signifikant gesteigerte Zytotoxizität gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄-exprimierende Melanome, die im Gegensatz zu CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen mit einer effizienten Tumorkontrolle assoziiert war [150].

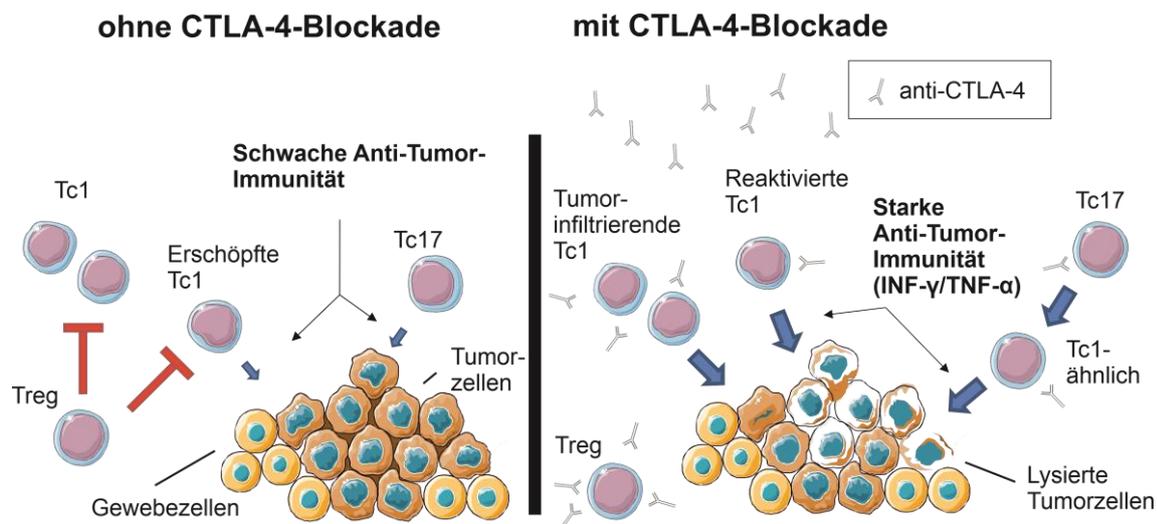


Abbildung 18: Modell zur möglichen Wirkung von anti-CTLA-4 auf T-Zellen im Mikromilieu des Tumors

Links: Über immunsuppressive Mechanismen wird eine effiziente T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Immunität durch Treg, T-Zell-Erschöpfung und ein Tc17-förderndes Mikromilieu gehemmt. **Rechts:** Nach CTLA-4-Blockade werden Tc1-Zellen reaktiviert und de-novo differenziert, die verstärkt den Tumor infiltrieren. Durch eine gesteigerte Plastizität wandeln sich Tc17-Zellen in Tc1-ähnliche Zellen mit hoher Zytotoxizität. Treg werden inaktiviert. Grafische Elemente wurden mit Hilfe der Vorlagen von Servier Medical Art erstellt (www.servier.de/medicalart).

Neben einer Steigerung der Plastizität von Tc17-Zellen könnte eine CTLA-4-Blockade außerdem die Anzahl an de-novo-differenzierten Tc1-Zellen erhöhen. Naive CD8⁺-T-Zellen könnten durch eine CTLA-4-Blockade nach tumorantigen-spezifischer Aktivierung verstärkt in Tc1-Zellen differenzieren [100], trotz eines Tc17-fördernden Mikromilieus (Abb. 18). Dementsprechend konnte in Patienten, die mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, eine stark ansteigende Zellzahl von CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, die hauptsächlich auf neu aktivierten CD8⁺ T-Zellen beruhten [189]. Die Anzahlen der bereits vor CTLA-4-Blockade aktivierten CD8⁺ T-Zellen stiegen hingegen nur geringfügig an [189].

Ein möglicher Effekt der CTLA-4-Blockade auf die de-novo T-Zell-Differenzierung lässt sich in unserem kurzfristigen Infektions-Modell jedoch nicht untersuchen, da bereits differenzierte Tc17-Zellen transferiert wurden und durch den kurzen Untersuchungszeitraum von zwei Tagen der Einfluss des endogenen adaptiven Immunsystems reduziert wurde. In unserem Modell ergaben sich daher keine Hinweise auf erhöhte Anzahlen an antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen [112] oder eine gesteigerte T-Zell-Motilität [190], da nach Transfer ähnliche Tc17-Zellzahlen detektiert wurden (Abb. 15 C).

In Anbetracht des chronischen Verlaufes von Tumorerkrankungen kommen möglicherweise auch andere Wirkmechanismen zum Tragen, die durch eine CTLA-4-Blockade beeinflusst werden und eine verbesserte Anti-Tumor-Immunität ermöglichen (Abb. 18). In mehreren Tumorentitäten konnte bereits bewiesen werden, dass „erschöpfte“ CD8⁺ T-Zellen mit reduzierter Anti-Tumor-Wirkung nach

anti-CTLA-4-Gabe erneut proliferieren und den Tumor infiltrieren [191]. Interessanterweise zeigten diese „erschöpften“ CD8⁺ T-Zellen eine erhöhte Expression von CTLA-4 [132],[192] und dem zentralen Tc17-Faktor STAT-3 [193],[194]. Mittels eines CTLA-4-bindenden Aptamers, das mit einer STAT-3-si-RNA gekoppelt war, gelang es experimentell die STAT-3-Expression gezielt in diesen „erschöpften“ CTLA-4-exprimierenden CD8⁺ T-Zellen zu inhibieren [193]. In der Folge konnten erhöhte Anzahlen tumorantigen-spezifischer, IFN- γ ⁺ T-Zellen detektiert werden, während die Treg-Anzahl abnahm. Dieser Effekt war mit einer signifikanten Tumorregression assoziiert [193]. Die Daten belegen eindeutig einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von „erschöpften“ CD8⁺ T-Zellen, die CTLA-4 und STAT-3 exprimieren und einen Tumorprogress bedingen, der durch eine gezielte Manipulation der STAT-3-Expression reversibel ist. Auch wenn nicht die IL-17-Expression untersucht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Tc17-Zellen handeln könnte. Die Erkenntnisse, dass CTLA-4 die Tc17-Differenzierung STAT-3-vermittelt fördert und so die Zytotoxizität und Anti-Tumor-Wirkung reduziert [150], lassen vermuten, dass „erschöpfte“ Tc-Zellen durch eine CTLA-4-Blockade über ein vermindertes p-STAT-3/p-STAT-1-Verhältnis reaktiviert werden könnten.

Neben der direkten Beeinflussung von CD8⁺ T-Zellen zeigten sich nach CTLA-4-Blockade auch indirekte Effekte über Treg [195],[196], die Tc1-Zellen hemmen und zu einer Stabilisierung des Tc17-Phänotyps [52] beitragen können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Treg CTLA-4-vermittelt CD8⁺ T-Gedächtniszellen in einen inaktiven Ruhezustand versetzen können. Nach Treg-Depletion wandelten sich die ruhenden CD8⁺ T-Zellen wieder in einen Granzyme B⁺, KLRG-1^{high}/IL-7R α ^{low}-Effektorzellen-Phänotyp um und zeigten eine gesteigerte Funktionalität [197]. In mehreren Studien führte die Gabe von anti-CTLA-4 ebenfalls zu einer Zunahme des CD8⁺ T-Zellen/Treg-Verhältnisses, was mit einer deutlich gesteigerten Tumor-Immunität assoziiert war [191],[198].

Ob dieser Effekt primär auf der Abnahme von tumorantigen-spezifischen Treg beruht [198] oder lediglich durch die relative Zunahme der T-Effektorzellen (bei unveränderter Anzahl an tumorinfiltrierenden Treg) bedingt wird [199], ist nicht abschließend geklärt. In unserem Infektionsmodell ist ein indirekter Einfluss durch Treg-Zellen unwahrscheinlich, da hochgradig angereicherte Tc17-Zellen transferiert und kurzfristige Zeiträume untersucht wurden, so dass der Einfluss des endogenen adaptiven Immunsystems und eventuell vorhandener Treg gering ist.

9.13 Herausforderungen für die Immuncheckpoint-Inhibitoren

Die vorliegenden Ergebnisse, dass CTLA-4 die Tc17-Differenzierung und -Stabilität fördert und durch CTLA-4-Blockade ein Tc1-ähnlicher zytotoxischer Phänotyp induziert wird, könnten dazu beitragen, Therapieergebnisse von anti-CTLA-4 besser zu erklären und zukünftig zu optimieren. Es ist bisher nur unvollständig verstanden, warum anti-CTLA-4-behandelte Patienten nicht gleichermaßen von der

Immuncheckpoint-Blockade profitieren und bei wem starke Nebenwirkungen auftreten [200]. Die bisherigen Daten verdeutlichen, dass der Therapieerfolg sowohl von patienten- als auch tumorabhängigen Faktoren bestimmt wird. Neben der Differenzierung und „Erschöpfung“ tumorinfiltrierender T-Zellen sind ebenfalls die Expression von weiteren immunregulatorischen Faktoren (wie PD-1, ICOS [201] oder VISTA [129]), das Vorhandensein anderer Immunzellen (Immunosom) [202] und das Mikrobiom des Magen-Darm-Traktes [203] für die Wirksamkeit von anti-CTLA entscheidend. Ferner sind das Tumorstadium, das zelluläre und metabolische Tumormikromilieu, Mechanismen der räumlichen Exklusion von T-Zellen [204], die Antigenität [133] sowie weitere genetische Eigenschaften des Tumors [205],[206] von Bedeutung.

Die Erkenntnisse, dass eine CTLA-4-Blockade die Plastizität von Tc17-Zellen erhöht, die IFN- γ /TNF- α -Koproduktion fördert (Abb. 14, 16) und so die Zytotoxizität erhöht (Abb. 15, 17), trägt dazu bei, Therapieeffekte von anti-CTLA-4 besser zu verstehen. Dem stehen jedoch verschiedene Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber: So konnte gezeigt werden, dass Melanome mit Mutationen in der IFN- γ -Signaltransduktionskaskade schlechter auf anti-CTLA-4 ansprechen [207], vermutlich da der zytotoxische Effekt von IFN- γ der Tc1- und konvertierten Tc17-Zellen (Abb. 14, 16) begrenzt wird. Ferner ist bekannt, dass Melanomzellen auf eine chronische IFN- γ -Exposition Resistenzmechanismen entwickeln können, die über die Expression immuninhibitorischer Moleküle zu einer verminderten Suszeptibilität der Tumorzellen und einer Erschöpfung der T-Zellen führen können [208]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass IFN- γ in Tumorzellen FasL induzieren kann, was in tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen Fas/FasL-vermittelt Apoptose auslösen und zu einer ineffektiven Tumorummunität beitragen kann [209].

Dies verdeutlicht, dass oftmals eine einzige therapeutische Intervention (wie eine CTLA-4-Blockade) nicht ausreicht, um die Immunevasion des Tumors vollständig zu überwinden [124]. Andere immunsuppressive Mechanismen können kompensatorisch aktiviert werden und die T-Zellen im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmen [210]. So konnte in anti-CTLA-4-behandelten Patienten posttherapeutisch eine erhöhte Expression von PD-1/PD-L1 auf T-Zellen bzw. Tumorzellen detektiert werden [129], die Apoptose und Anergie in aktivierten T-Effektorzellen auslösen sowie die Treg-Bildung induzieren kann [125],[126]. Interessanterweise sprachen diejenigen Patienten besser auf eine anti-PD-1-Therapie an, die prätherapeutisch erhöhte Anzahlen an CD8⁺ T-Zellen mit hoher PD-1-/PD-L1-Expression im Tumormikromilieu aufwiesen [200] und somit einen Angriffspunkt für die anti-PD-1-/PD-L1-Therapie lieferten. Diese Patienten zeigten posttherapeutisch eine erhöhte STAT-1-Expression in den tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen und eine gesteigerte Tumorregression [200].

Da eine CTLA-4-Blockade ebenfalls die STAT-1-Aktivierung [150] sowie die Konversion in einen Tc1-ähnlichen Phänotyp fördern kann (Abb. 14, 16) und gleichzeitig zu einer gesteigerten PD-1/PD-L1-Expression auf T-Zellen führt [129],[210], ist die anti-PD1-Therapie eine vorteilhafte Ergänzung zu anti-CTLA-4 und könnte die synergistischen Therapieerfolge erklären [128]. Ob bzw. wie CTLA-4 direkten Einfluss auf PD-1 und PD-1-vermittelte Mechanismen nimmt, ist bisher nicht geklärt.

Neben CTLA-4 und PD-1 könnten zukünftig auch weitere T-Zell-regulatorische Faktoren wie ICOS (engl.: inducible costimulator) als Ziel von Kombinationstherapien an Bedeutung gewinnen. ICOS ist ein T-Zellen-spezifisches Molekül der CD28/CTLA-4-Familie, das nach T-Zell-Aktivierung gebildet und nach CTLA-4-Blockade verstärkt auf tumorspezifischen IFN- γ ⁺ T-Zellen nachweisbar war [201]. Interessanterweise führt eine ICOS-Defizienz in CD8⁺ T-Zellen zu einer selektiven Unterdrückung von Eomes und IFN- γ (nicht jedoch T-Bet), mit verminderter Tumormunität [211]. Ob diese Zellen IL-17 bilden wurde nicht geprüft. Durch eine gezielte ICOS-Stimulation in IL-17⁺ Tc17-Zellen konnte eine IL-17⁺/IFN- γ ⁺-Koproduktion induziert werden, die mit einer gesteigerten IFN- γ -abhängigen Anti-Tumor-Immunität assoziiert war [212]. Da CTLA-4 den Tc17-Phänotyp stabilisiert (Abb. 14, 16) und Eomes und IFN- γ supprimiert (Abb. 13), könnte in zukünftigen Studien überprüft werden, ob CTLA-4 über eine Hemmung von ICOS zu einer verminderten Tumormunität beiträgt. Durch eine CTLA-4-Blockade und gleichzeitige ICOS-Aktivierung konnten die Zellzahlen an tumorspezifischen ICOS⁺ T-Zellen erhöht werden, die IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺/Granzyme B⁺ waren und eine signifikant erhöhte Anti-Tumor-Immunität aufwiesen [201]. Diese synergistischen Effekte verdeutlichen, dass Erkenntnisse über die Wirkmechanismen CTLA-4s und die Beeinflussung anderer immuninhibitorischer Signalwege durch eine CTLA-4-Blockade notwendig sind, um die immunbasierte Therapie zu optimieren.

Die immunbasierte Tumorthherapie wird zukünftig zunehmend individualisiert werden, um für jeden Patienten die optimale Therapie wählen, Nebenwirkungen reduzieren sowie das Therapieansprechen und den Behandlungsverlauf bewerten zu können [213]. Expressionsprofile von CD8⁺ T-Zellen (Abb. 13) könnten dazu beitragen, Therapieansprechen genauer vorherzusagen und werden bereits im Rahmen sog. immunprädiktiver Scores geprüft, um den individuellen Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren zu optimieren [214]. Durch einen gezielteren Einsatz könnten möglicherweise auch die hohen Behandlungskosten (oftmals 50.000-100.000 EUR pro Patient) in ihrer Gesamtheit reduziert werden, die eine gesundheitsökonomische Herausforderung darstellen [215].

Dass Tc17-Zellen nach CTLA-4-Blockade eine erhöhte Persistenz im Vergleich zu Tc1-Zellen aufweisen (Abb. 15 C) und ihre Zytotoxizität gegenüber CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen gesteigert ist (Abb. 15 B, 17), könnte auch für die Weiterentwicklung von T-Zell-Therapien von Interesse sein. Hierbei werden

patienteneigene T-Zellen entnommen, tumorantigen-spezifische T-Zellen angereichert und dem Patienten erneut zugeführt [216]. Durch eine gezielte Modifikation der Kostimulationsbedingungen ex-vivo, wie z.B. durch eine CTLA-4-Blockade (durch Antikörper, siRNA oder CRISPR/Cas9-Knock-out [188]), könnten die T-Effektorzellen vor dem adoptiven Transfer optimiert werden, um eine höhere Tumormunität zu erzielen [217].

Auch für sog. CAR-T-Zell-Verfahren (engl.: chimeric antigen receptor) könnten die dargestellten Erkenntnisse nützlich sein. Hierbei werden patienteneigene T-Zellen entnommen und durch virale Gentransfervektoren ein chimärer Antigenrezeptor eingebracht, der eine tumorspezifische Immunantwort ermöglicht. CD19-spezifische CAR-T-Zellen sind bereits bei ausgewählten Formen der akuten B-Zell-Leukämie zugelassen und konnten in bis zu 90 % der Patienten ein positives Therapieansprechen verzeichnen [218]. Mehrere Studien prüfen aktuell den Einsatz von CAR-T-Zellen bei diversen soliden Tumoren [219]. Experimentelle Daten liefern bereits Hinweise darauf, dass durch die Blockade von CTLA-4 die therapeutische Effektivität von CAR-T-Zellen weiter erhöht werden kann [220]. Ähnlich wie bei den Immuncheckpoint-Inhibitoren stehen den Therapierfolgen jedoch große Hürden gegenüber, wie begrenzte Anwendungsbereiche, sehr hohe Therapiekosten (bis zu 500.000 USD) sowie teilweise schwere autoinflammatorische Nebenwirkungen durch starke Zytokin-Freisetzung [221]. Die Erkenntnisse über die CTLA-4-vermittelte Steuerung der T-Zell-Immunität könnten daher dazu beitragen, zukünftige immunbasierte Therapien zu optimieren.

10 Zusammenfassung

Da sich die Tc1- und Tc17-Programme gegenseitig hemmen und CTLA-4 über eine Suppression von Eomes spezifisch die Tc1-Differenzierung inhibieren kann, sollte in dieser Arbeit der Einfluss von CTLA-4 auf die Tc17-Differenzierung und -Phänotypstabilität untersucht werden.

Hierbei zeigte sich, dass CTLA-4-kompetente Tc17-Zellen eine annähernd doppelt so hohe Anzahl an IL-17-Produzenten (bis 50%) und eine bis zu fünffach höhere IL-17-Sekretion aufwiesen. In Anbetracht der erhöhten IL-17-Expression pro Tc17-Zelle zeigten diese Daten erstmals, dass CTLA-4 das Tc17-Programm fördert. Da die Expression von Foxp3, IL-4 oder TNF- α unter Tc17-Bedingungen nicht signifikant verändert war, handelte es sich um eine spezifische Verstärkung des Tc17-Programmes. Dieser CTLA-4-vermittelte Effekt war unabhängig von den Tc1-fördernden Faktoren IL-2 und IFN- γ sowie unabhängig von der Stärke der TZR- bzw. CD28-Stimulation, da bei Aktivierung mit verschiedenen Antigendosen sowie mittels anti-CD3/anti-CD28 identische Ergebnisse reproduziert werden konnten. Auch nach Ko-Kultivierung der CTLA-4^{+/+} und CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen (mit identischen zellulären und extrazellulären Stimulationsbedingungen) zeigten CTLA-4-kompetente Tc17-Zellen eine doppelt so hohe IL-17-Bildung, so dass der Einfluss CTLA-4s auf die Tc17-Differenzierung T-Zell-intrinsisch war.

IL-17⁺ CTLA-4^{+/+} Tc17-Zellen zeigten im Vergleich zu CTLA-4-defizienten IL-17⁺ Tc17-Zellen eine erhöhte Expression des zentralen Transkriptionsfaktors ROR γ t sowie weiterer Tc17-fördernder Faktoren wie ROR α , IRF-4 und IL-23R. Dies war mit einer erhöhten Stabilität des Tc17-typischen Phänotyps sowohl in-vitro als auch in-vivo assoziiert. In einem LM-Infektionsmodell zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen eine gesteigerte Plastizität in-vivo mit Konversion in einen Tc1-ähnlichen, IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ Phänotyp. CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen verfügten dementsprechend über eine erhöhte LM-Immunität, die mit Tc1-Zellen vergleichbar war. Auch in-vitro zeigten CTLA-4^{-/-} Tc17-Zellen nach Restimulation eine signifikant erhöhte Plastizität und Zytotoxizität.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass CTLA-4-vermittelte Signale die Tc17-Differenzierung zell-intrinsisch unterstützen und so eine höhere Qualität des Tc17-Programmes vermitteln, was mit einer erhöhten Stabilität des Tc17-Phänotyps assoziiert ist. Eine CTLA-4-Defizienz beeinflusst demzufolge die CD8⁺ T-Zell-Immunität auf zwei Wegen: Zum einen wird die Tc17-Differenzierung gehemmt, zum anderen wird die Tc17-Phänotyp-Stabilität reduziert, so dass nicht-zytotoxische Tc17-Zellen in einen Tc1-ähnlichen Zustand mit erhöhter Zytotoxizität konvertieren können. Diese Erkenntnisse erweitern das Wissen über die CTLA-4-vermittelte Kontrolle der CD8⁺ T-Zell-Differenzierung. Sie können dazu beitragen, Effekte einer therapeutischen Manipulation des CTLA-4-Signals (z.B. durch anti-CTLA-4) besser zu verstehen, um zukünftige Therapien von malignen Erkrankungen zu optimieren.

11 Literaturverzeichnis

1. **Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL.** The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 2017; **35**:149–176.
2. **Mescher MF, Agarwal P, Casey KA, Hammerbeck CD, Xiao Z, Curtsinger JM.** Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin.Immunol.* 2007; **19**:153–161.
3. **Casey KA, Mescher MF.** IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J.Immunol.* 2007; **178**:7640–7648.
4. **Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM.** The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat.Rev.Immunol.* 2016; **16**:102–111.
5. **Gerard A, Khan O, Beemiller P, Oswald E, Hu J, Matloubian M, Krummel MF.** Secondary T cell-T cell synaptic interactions drive the differentiation of protective CD8(+) T cells. *Nat.Immunol.* 2013; **14**:356–363.
6. **Nembrini C, Abel B, Kopf M, Marsland BJ.** Strong TCR signaling, TLR ligands, and cytokine redundancies ensure robust development of type 1 effector T cells. *J.Immunol.* 2006; **176**:7180–7188.
7. **Verdeil G, Chaix J, Schmitt-Verhulst AM, uphan-Anezin N.** Temporal cross-talk between TCR and STAT signals for CD8 T cell effector differentiation. *Eur.J.Immunol.* 2006; **36**:3090–3100.
8. **Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT.** Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat.Immunol.* 2005; **6**:1123–1132.
9. **Hoyer S, Prommersberger S, Pfeiffer IA, Schuler-Thurner B, Schuler G, Dorrie J, Schaft N.** Concurrent interaction of DCs with CD4(+) and CD8(+) T cells improves secondary CTL expansion: It takes three to tango. *Eur.J.Immunol.* 2014; **44**:3543–3559.
10. **Sprent J, Surh CD.** Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat.Immunol.* 2011; **12**:478–484.
11. **Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, et al.** Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 2007; **27**:281–295.
12. **Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R.** Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat.Immunol.* 2003; **4**:1191–1198.
13. **Kaech SM, Cui W.** Transcriptional control of effector and memory CD8(+) T cell differentiation. *Nat.Rev.Immunol.* 2012; **12**:749–761.
14. **Surh CD, Sprent J.** Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008; **29**:848–862.
15. **Durek P, Nordström K, Gasparoni G, Salhab A, Kressler C, de Almeida M, Bassler K, et al.** Epigenomic Profiling of Human CD4+ T Cells Supports a Linear Differentiation Model and Highlights Molecular Regulators of Memory Development. *Immunity.* 2016; **45**:1148–1161.

-
16. **Stoycheva D, Deiser K, Starck L, Nishanth G, Schluter D, Uckert W, Schuler T.** IFN-gamma regulates CD8+ memory T cell differentiation and survival in response to weak, but not strong, TCR signals. *J.Immunol.* 2015; **194**:553–559.
17. **Banerjee A, Gordon SM, Intlekofer AM, Paley MA, Mooney EC, Lindsten T, Wherry EJ, et al.** Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J.Immunol.* 2010; **185**:4988–4992.
18. **Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW.** Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J.Exp.Med.* 1994; **180**:1715–1728.
19. **Liu SJ, Tsai JP, Shen CR, Sher YP, Hsieh CL, Yeh YC, Chou AH, et al.** Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J.Leukoc.Biol.* 2007; **82**:354–360.
20. **Zhang N, Bevan MJ.** CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 2011; **35**:161–168.
21. **Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM.** Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2004; **4**:900–911.
22. **Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH.** A novel transcription factor, Tbet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000; **100**:655–669.
23. **Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, et al.** Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 2007; **26**:371–381.
24. **Lloyd CM, Hessel EM.** Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2010; **10**:838–848.
25. **Mittrucker HW, Visekruna A, Huber M.** Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch.Immunol.Ther.Exp.* 2014; **62**:449–458.
26. **Mahic M, Henjum K, Yaqub S, Bjornbeth BA, Torgersen KM, Tasken K, Aandahl EM.** Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur.J.Immunol.* 2008; **38**:640–646.
27. **Nakagawa H, Wang L, Cantor H, Kim H-J.** New Insights Into the Biology of CD8 Regulatory T Cells. *Adv. Immunol.* 2018; **140**:1–20.
28. **Kim H-J, Barnitz RA, Kreslavsky T, Brown FD, Moffett H, Lemieux ME, Kaygusuz Y, et al.** Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science (80-).* 2015; **350**:334–339.
29. **Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, et al.** The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006; **126**:1121–1133.
30. **Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hunig T, et al.** A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur.J.Immunol.* 2009; **39**:1716–1725.
31. **Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg M V, Liang KL, et al.** Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J.Immunol.* 2009; **183**:7161–7168.

-
32. **Huber M, Brustle A, Reinhard K, Guralnik A, Walter G, Mahiny A, von LE, et al.** IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2008; **105**:20846–20851.
33. **Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, et al.** T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* 2008; **28**:29–39.
34. **Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, et al.** Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008; **29**:44–56.
35. **Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, et al.** Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature.* 2010; **467**:967–971.
36. **Kryczek I, Wei S, Vatan L, Escara-Wilke J, Szeliga W, Keller ET, Zou W.** Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J.Immunol.* 2007; **179**:1423–1426.
37. **Massot B, Michel ML, Diem S, Ohnmacht C, Latour S, Dy M, Eberl G, et al.** TLR-induced cytokines promote effective proinflammatory natural Th17 cell responses. *J.Immunol.* 2014; **192**:5635–5642.
38. **Jetten AM.** Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 2009; **7**:e003.
39. **Hamada H, Garcia-Hernandez ML, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, Cooper AM, et al.** Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J.Immunol.* 2009; **182**:3469–3481.
40. **Nanjappa SG, Heninger E, Wuthrich M, Gasper DJ, Klein BS.** Tc17 Cells Mediate Vaccine Immunity against Lethal Fungal Pneumonia in Immune Deficient Hosts Lacking CD4(+) T Cells. *PLoS.Pathog.* 2012; **8**:e1002771.
41. **Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, Guralnik A, et al.** IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J.Clin.Invest.* 2012; **123**(1):247–260.
42. **Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, et al.** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; **441**:235–238.
43. **Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, et al.** IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J.Clin.Invest.* 2006; **116**:1310–1316.
44. **Tajima M, Wakita D, Noguchi D, Chamoto K, Yue Z, Fugo K, Ishigame H, et al.** IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J.Exp.Med.* 2008; **205**:1019–1027.
45. **Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, et al.** Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* 2003; **198**:1951–1957.
46. **Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Aphale A, Vatan L, Szeliga W, et al.** Induction of

IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J.Immunol.* 2008; **181**:4733–4741.

47. **Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CE, Papp K, Puig L, et al.** Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N.Engl.J.Med.* 2014; **371**:326–338.

48. **Baeten D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, Dougados M, Emery P, Deodhar A, et al.** Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N. Engl. J. Med.* 2015; **373**:2534–2548.

49. **Gartlan KH, Markey KA, Varelias A, Bunting MD, Koyama M, Kuns RD, Raffelt NC, et al.** Tc17 cells are a proinflammatory, plastic lineage of pathogenic CD8+ T cells that induce GVHD without antileukemic effects. *Blood.* 2015; **126**:1609–1620.

50. **Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, et al.** Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J.Immunol.* 2007; **178**:6730–6733.

51. **Chellappa S, Hugenschmidt H, Hagness M, Subramani S, Melum E, Line PD, Labori K-J, et al.** CD8 + T Cells That Coexpress ROR γ t and T-bet Are Functionally Impaired and Expand in Patients with Distal Bile Duct Cancer. *J. Immunol.* 2017; **198**:1729–1739.

52. **Tsai JP, Lee MH, Hsu SC, Chen MY, Liu SJ, Chang JT, Liao CT, et al.** CD4+ T Cells Disarm or Delete Cytotoxic T Lymphocytes under IL-17-Polarizing Conditions. *J.Immunol.* 2012; **189**:1671–1679.

53. **Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, et al.** Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur.J.Immunol.* 2010; **40**:1927–1937.

54. **Opitz CA, Litzemberger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, et al.** An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 2011; **478**:197–203.

55. **Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, et al.** Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J.Hepatol.* 2009; **50**:980–989.

56. **Hinrichs CS, Kaiser A, Paulos CM, Cassard L, Sanchez-Perez L, Heemskerk B, Wrzesinski C, et al.** Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood.* 2009; **114**:596–599.

57. **Garcia-Hernandez ML, Hamada H, Reome JB, Misra SK, Tighe MP, Dutton RW.** Adoptive transfer of tumor-specific Tc17 effector T cells controls the growth of B16 melanoma in mice. *J.Immunol.* 2010; **184**:4215–4227.

58. **Punt S, Langenhoff JM, Putter H, Fleuren GJ, Gorter A, Jordanova ES.** The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review. *Oncoimmunology.* 2015; **4**:e984547.

59. **Fischer A.** Human immunodeficiency: connecting STAT3, Th17 and human mucosal immunity. *Immunol.Cell Biol.* 2008; **86**:549–551.

60. **Meller S, Di DJ, Voo KS, Friedrich HC, Chamilos G, Ganguly D, Conrad C, et al.** TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat.Immunol.* 2015; **16**:970–979.

61. **Nurieva R, Yang XO, Chung Y, Dong C.** Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their

cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts. *J.Immunol.* 2009; **182**:2565–2568.

62. **Bending D, De La PH, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A.** Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J.Clin.Invest.* 2009; **119**:423–673.
63. **El-behi M, Dai H, Magalhaes JG, Hwang D, Zhang GX, Rostami A, Ciric B.** Committed Tc17 cells are phenotypically and functionally resistant to the effects of IL-27. *Eur.J.Immunol.* 2014; **44**:3003–3014.
64. **Saxena A, Desbois S, Carrie N, Lawand M, Mars LT, Liblau RS.** Tc17 CD8+ T Cells Potentiate Th1-Mediated Autoimmune Diabetes in a Mouse Model. *J.Immunol.* 2012; **189**:3140–3149.
65. **Yu Y, Cho HI, Wang D, Kaosaard K, Anasetti C, Celis E, Yu XZ.** Adoptive Transfer of Tc1 or Tc17 Cells Elicits Antitumor Immunity against Established Melanoma through Distinct Mechanisms. *J.Immunol.* 2013; **190**:1873–81.
66. **Satoh T, Tajima M, Wakita D, Kitamura H, Nishimura T.** The development of IL-17/IFN-gamma-double producing CTLs from Tc17 cells is driven by epigenetic suppression of Socs3 gene promoter. *Eur.J.Immunol.* 2012; **42**:2329–2342.
67. **Shi G, Cox CA, Vistica BP, Tan C, Wawrousek EF, Gery I.** Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J.Immunol.* 2008; **181**:7205–7213.
68. **Kimura A, Naka T, Kishimoto T.** IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2007; **104**:12099–12104.
69. **Tajima M, Wakita D, Satoh T, Kitamura H, Nishimura T.** IL-17/IFN-gamma double producing CD8+ T (Tc17/IFN-gamma) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int.Immunol.* 2011; **23**:751–759.
70. **Sieve AN, Meeks KD, Lee S, Berg RE.** A novel immunoregulatory function for IL-23: Inhibition of IL-12-dependent IFN-gamma production. *Eur.J.Immunol.* 2010; **40**:2236–2247.
71. **Suto A, Wurster AL, Reiner SL, Grusby MJ.** IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J.Immunol.* 2006; **177**:3721–3727.
72. **Brustle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, et al.** The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat.Immunol.* 2007; **8**:958–966.
73. **Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, Hunter CA, et al.** Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science.* 2008; **321**:408–411.
74. **Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, Mullen AC, et al.** Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat.Immunol.* 2005; **6**:1236–1244.
75. **Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, et al.** Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science.* 2003; **302**:1041–1043.
76. **Yang Y, Xu J, Niu Y, Bromberg JS, Ding Y.** T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T

cell differentiation to Th1 versus Th17. *J.Immunol.* 2008; **181**:8700–8710.

77. **Ciric B, El-behi M, Cabrera R, Zhang GX, Rostami A.** IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J.Immunol.* 2009; **182**:5296–5305.

78. **Gocke AR, Cravens PD, Ben LH, Hussain RZ, Northrop SC, Racke MK, Lovett-Racke AE.** T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J.Immunol.* 2007; **178**:1341–1348.

79. **Ciucci T, Vacchio MS, Bosselut R.** A STAT3-dependent transcriptional circuitry inhibits cytotoxic gene expression in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017; **114**:13236–13241.

80. **Zhang F, Meng G, Strober W.** Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat.Immunol.* 2008; **9**:1297–1306.

81. **Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, Hirahara K, et al.** Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat.Immunol.* 2011; **12**:247–254.

82. **Lazarevic V, Chen X, Shim JH, Hwang ES, Jang E, Bolm AN, Oukka M, et al.** T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. *Nat.Immunol.* 2011; **12**:96–104.

83. **Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, Groner Y, et al.** Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J.Exp.Med.* 2009; **206**:51–59.

84. **Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, et al.** TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J.Immunol.* 2009; **183**:97–105.

85. **Chen Z, Laurence A, O’Shea JJ.** Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin.Immunol.* 2007; **19**:400–408.

86. **Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, et al.** Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2006; **103**:8137–8142.

87. **Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M, Yoshida H, Takimoto T, Takaesu G, Torisu T, et al.** Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads. *J.Immunol.* 2008; **180**:3746–3756.

88. **Egen JG, Kuhns MS, Allison JP.** CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat.Immunol.* 2002; **3**:611–618.

89. **Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, et al.** Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science (80-.).* 1995; **270**:985–988.

90. **Chambers CA, Sullivan TJ, Allison JP.** Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity.* 1997; **7**:885–895.

91. **Pandiyani P, Hegel JK, Krueger M, Quandt D, Brunner-Weinzierl MC.** High IFN-gamma production of individual CD8 T lymphocytes is controlled by CD152 (CTLA-4). *J.Immunol.* 2007; **178**:2132–2140.

-
92. **Rudd CE, Taylor A, Schneider H.** CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol.Rev.* 2009; **229**:12–26.
93. **Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP.** B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* 2004; **21**:401–413.
94. **Berg M, Zavazava N.** Regulation of CD28 expression on CD8+ T cells by CTLA-4. *J.Leukoc.Biol.* 2008; **83**:853–863.
95. **Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, et al.** Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science (80-).* 2006; **313**:1972–1975.
96. **Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, Mak TW.** Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science (80-).* 1996; **272**:1170–1173.
97. **Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP.** CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J.Immunol.* 1999; **162**:5813–5820.
98. **Chambers CA, Kuhns MS, Allison JP.** Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4(+) T cell responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999; **96**:8603–8608.
99. **Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, et al.** Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (80-).* 2011; **332**:600–603.
100. **Hegel JK, Knieke K, Kolar P, Reiner SL, Brunner-Weinzierl MC.** CD152 (CTLA-4) regulates effector functions of CD8+ T lymphocytes by repressing Eomesodermin. *Eur.J.Immunol.* 2009; **39**:883–893.
101. **Thaventhiran JE, Hoffmann A, Magiera L, de la RM, Lingel H, Brunner-Weinzierl M, Fearon DT.** Activation of the Hippo pathway by CTLA-4 regulates the expression of Blimp-1 in the CD8+ T cell. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2012; **109**:E2223–E2229.
102. **Lingel H, Wissing J, Arra A, Schanze D, Lienenklaus S, Klawonn F, Pierau M, et al.** CTLA-4-mediated posttranslational modifications direct cytotoxic T-lymphocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 2017; **24**:1739–1749.
103. **Leach DR, Krummel MF, Allison JP.** Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (80-).* 1996; **271**:1734–1736.
104. **Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, et al.** Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N.Engl.J.Med.* 2010; **363**:711–723.
105. **Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, Waterfield W, et al.** Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol.* 2010; **11**:155–164.
106. **Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Cowey CL, Lao CD, et al.** Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* 2018; **19**:1480–1492.

107. **Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, Patt D, et al.** Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2015; **33**:1889–1894.
108. **Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Aren Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, Plimack ER, et al.** Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2018; **378**:1277–1290.
109. **Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, Morse MA, et al.** Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2018; **36**:773–779.
110. **Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim S-W, Carcereny Costa E, Park K, et al.** Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2019; **381**:2020–2031.
111. **Prieto PA, Yang JC, Sherry RM, Hughes MS, Kammula US, White DE, Levy CL, et al.** CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clin.Cancer Res.* 2012; **18**:2039–2047.
112. **Huang RR, Jalil J, Economou JS, Chmielowski B, Koya RC, Mok S, Sazegar H, et al.** CTLA4 blockade induces frequent tumor infiltration by activated lymphocytes regardless of clinical responses in humans. *Clin.Cancer Res.* 2011; **17**:4101–4109.
113. **Klein O, Ebert LM, Nicholaou T, Browning J, Russell SE, Zuber M, Jackson HM, et al.** Melan-A-specific cytotoxic T cells are associated with tumor regression and autoimmunity following treatment with anti-CTLA-4. *Clin.Cancer Res.* 2009; **15**:2507–2513.
114. **Ribas A, Comin-Anduix B, Economou JS, Donahue TR, de la RP, Morris LF, Jalil J, et al.** Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade. *Clin.Cancer Res.* 2009; **15**:390–399.
115. **Wolchok JD, Saenger Y.** The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist.* 2008; **13 Suppl 4**:2–9.
116. **van EA, Suttmuller RP, Hurwitz AA, Ziskin J, Villasenor J, Medema JP, Overwijk WW, et al.** Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J.Exp.Med.* 2001; **194**:481–489.
117. **Maker A V, Attia P, Rosenberg SA.** Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J.Immunol.* 2005; **175**:7746–7754.
118. **Wang W, Yu D, Sarnaik AA, Yu B, Hall M, Morelli D, Zhang Y, et al.** Biomarkers on melanoma patient T cells associated with ipilimumab treatment. *J.Transl.Med.* 2012; **10**:146.
119. **Wu L, Yun Z, Tagawa T, Rey-McIntyre K, de PM.** CTLA-4 Blockade Expands Infiltrating T Cells and Inhibits Cancer Cell Repopulation during the Intervals of Chemotherapy in Murine Mesothelioma. *Mol.Cancer Ther.* 2012; **11**:1809–1819.
120. **Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, Rasalan TS, Ritter E, Gallardo HF, Xu Y, et al.** Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2011; **108**:16723–16728.

-
121. **Paradis TJ, Floyd E, Burkweit J, Cole SH, Brunson B, Elliott E, Gilman S, et al.** The anti-tumor activity of anti-CTLA-4 is mediated through its induction of IFN gamma. *Cancer Immunol.Immunother.* 2001; **50**:125–133.
122. **Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, Schilbach K, et al.** T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature.* 2013; **494**:361–365.
123. **Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, Ivanova Y, et al.** Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature.* 2014; **515**:577–581.
124. **Moynihan KD, Opel CF, Szeto GL, Tzeng A, Zhu EF, Engreitz JM, Williams RT, et al.** Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nat.Med.* 2016; **22**:1402–1410.
125. **Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP.** PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2010; **107**:4275–4280.
126. **Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH.** The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol.Rev.* 2010; **236**:219–242.
127. **Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, Lao CD, et al.** Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2017; **377**:1345–1356.
128. **Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, Linette GP, et al.** Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016; **17**:1558–1568.
129. **Gao J, Ward JF, Pettaway CA, Shi LZ, Subudhi SK, Vence LM, Zhao H, et al.** VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nat. Med.* 2017; **23**:551.
130. **Liu J, Yuan Y, Chen W, Putra J, Suriawinata AA, Schenk AD, Miller HE, et al.** Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; **112**:6682–6687.
131. **Wherry EJ, Kurachi M.** Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 2015; **15**:486–499.
132. **Baitsch L, Baumgaertner P, Devereux E, Raghav SK, Legat A, Barba L, Wieckowski S, et al.** Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J.Clin.Invest.* 2011; **121**:2350–2360.
133. **Brown SD, Warren RL, Gibb EA, Martin SD, Spinelli JJ, Nelson BH, Holt RA.** Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* 2014; **24**:743–750.
134. **Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, et al.** Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N.Engl.J.Med.* 2012; **366**:2443–2454.

-
135. **Aguilar EJ, Ricciuti B, Gainor JF, Kehl KL, Kravets S, Dahlberg S, Nishino M, et al.** Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression. *Ann. Oncol.* 2019; **30**:1653–1659.
136. **Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, Berent-Maoz B, et al.** Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell.* 2016; **165**:35–44.
137. **Hailemichael Y, Woods A, Fu T, He Q, Nielsen MC, Hasan F, Roszik J, et al.** Cancer vaccine formulation dictates synergy with CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade therapy. *J. Clin. Invest.* 2018; **128**:1338–1354.
138. **Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, et al.** Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* 2006; **203**:1259–1271.
139. **Kormendy D, Hoff H, Hoff P, Broker BM, Burmester GR, Brunner-Weinzierl MC.** Impact of the CTLA-4/CD28 axis on the processes of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013; **65**:81–87.
140. **Genant HK, Peterfy CG, Westhovens R, Becker JC, Aranda R, Vratsanos G, Teng J, et al.** Abatacept inhibits progression of structural damage in rheumatoid arthritis: results from the long-term extension of the AIM trial. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; **67**:1084–1089.
141. **Emery P, Burmester GR, Bykerk VP, Combe BG, Furst DE, Barre E, Karyekar CS, et al.** Evaluating drug-free remission with abatacept in early rheumatoid arthritis: results from the phase 3b, multicentre, randomised, active-controlled AVERT study of 24 months, with a 12-month, double-blind treatment period. *Ann. Rheum. Dis.* 2015; **74**:19–26.
142. **Mease PJ, Gottlieb AB, van der Heijde D, FitzGerald O, Johnsen A, Nys M, Banerjee S, et al.** Efficacy and safety of abatacept, a T-cell modulator, in a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III study in psoriatic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2017; **76**:1550–1558.
143. **Sandborn WJ, Colombel JF, Sands BE, Rutgeerts P, Targan SR, Panaccione R, Bressler B, et al.** Abatacept for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2012; **143**:62–69.
144. **Orban T, Bundy B, Becker DJ, Dimeglio LA, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, et al.** Costimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: follow-up 1 year after cessation of treatment. *Diabetes Care.* 2014; **37**:1069–1075.
145. **Seder RA, Darrah PA, Roederer M.** T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; **8**:247–258.
146. **Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA.** TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol.* 2006; **176**:3321–3329.
147. **Pandiyan P, Gartner D, Soezeri O, Radbruch A, Schulze-Osthoff K, Brunner-Weinzierl MC.** CD152 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3 kinase function. *J. Exp. Med.* 2004; **199**:831–842.
148. **Pick J, Arra A, Lingel H, Hegel JK, Huber M, Nishanth G, Jorch G, et al.** CTLA-4 (CD152) enhances the Tc17 differentiation program. *Eur. J. Immunol.* 2014; **44**:2139–2152.

-
149. **Purvis HA, Stoop JN, Mann J, Woods S, Kozijn AE, Hambleton S, Robinson JH, et al.** Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood*. 2010; **116**:4829–4837.
150. **Arra A, Lingel H, Kuropka B, Pick J, Schnoeder T, Fischer T, Freund C, et al.** The differentiation and plasticity of Tc17 cells are regulated by CTLA-4-mediated effects on STATs. *Oncoimmunology*. 2017; **6**:e1273300.
151. **Pamer EG.** Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat.Rev.Immunol.* 2004; **4**:812–823.
152. **Rowe JH, Johanns TM, Ertelt JM, Lai JC, Way SS.** Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 blockade augments the T-cell response primed by attenuated *Listeria monocytogenes* resulting in more rapid clearance of virulent bacterial challenge. *Immunology*. 2009; **128**:e471–e478.
153. **Zenewicz LA, Shen H.** Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes.Infect.* 2007; **9**:1208–1215.
154. **Yeh N, Glosson NL, Wang N, Guindon L, McKinley C, Hamada H, Li Q, et al.** Tc17 cells are capable of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. *J.Immunol.* 2010; **185**:2089–2098.
155. **Pedicord VA, Montalvo W, Leiner IM, Allison JP.** Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8+ T-cell memory formation, function, and maintenance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2011; **108**:266–271.
156. **Nakayama T, Yamashita M.** The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Semin.Immunol.* 2010; **22**:303–309.
157. **Bouguermouh S, Fortin G, Baba N, Rubio M, Sarfati M.** CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PLoS.One.* 2009; **4**:e5087.
158. **Ying H, Yang L, Qiao G, Li Z, Zhang L, Yin F, Xie D, et al.** Cutting edge: CTLA-4--B7 interaction suppresses Th17 cell differentiation. *J.Immunol.* 2010; **185**:1375–1378.
159. **McLane LM, Banerjee PP, Cosma GL, Makedonas G, Wherry EJ, Orange JS, Betts MR.** Differential Localization of T-bet and Eomes in CD8 T Cell Memory Populations. *J.Immunol.* 2013; **190**:3207–3215.
160. **Yao S, Buzo BF, Pham D, Jiang L, Taparowsky EJ, Kaplan MH, Sun J.** Interferon regulatory factor 4 sustains CD8+T cell expansion and effector differentiation. *Immunity*. 2013; **39**:833–845.
161. **Yu C-R, Kim S-H, Mahdi RM, Egwuagu CE.** SOCS3 Deletion in T Lymphocytes Suppresses Development of Chronic Ocular Inflammation via Upregulation of CTLA-4 and Expansion of Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 2013; **191**:5036–5043.
162. **Kleinstauber K, Heesch K, Schattling S, Sander-Juelch C, Mock U, Riecken K, Fehse B, et al.** SOCS3 promotes interleukin-17 expression of human T cells. *Blood*. 2012; **120**:4374–4382.
163. **Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T.** Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2008; **105**:9721–9726.
164. **Veldhoen M, Hirota K, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B.** Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J.Exp.Med.* 2008; **206**:43–49.

165. **Hayes MD, Ovcinnikovs V, Smith AG, Kimber I, Dearman RJ.** The aryl hydrocarbon receptor: differential contribution to T helper 17 and T cytotoxic 17 cell development. *PLoS.One.* 2014; **9**:e106955.
166. **Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, et al.** TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature.* 2008; **453**:236–240.
167. **Wan C-K, Andraski AB, Spolski R, Li P, Kazemian M, Oh J, Samsel L, et al.** Opposing roles of STAT1 and STAT3 in IL-21 function in CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; **112**:9394–9399.
168. **Curtis MM, Way SS, Wilson CB.** IL-23 promotes the production of IL-17 by antigen-specific CD8 T cells in the absence of IL-12 and type-I interferons. *J.Immunol.* 2009; **183**:381–387.
169. **McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, et al.** The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat.Immunol.* 2009; **10**:314–324.
170. **Krausgruber T, Schiering C, Adelmann K, Harrison OJ, Chomka A, Pearson C, Ahern PP, et al.** T-bet is a key modulator of IL-23-driven pathogenic CD4(+) T cell responses in the intestine. *Nat. Commun.* 2016; **7**:11627.
171. **Martinet V, Tonon S, Torres D, Azouz A, Nguyen M, Kohler A, Flamand V, et al.** Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells. *Nat. Commun.* 2015; **6**:7089.
172. **Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, et al.** Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity.* 2010; **32**:605–615.
173. **Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, Finkelstein SE, et al.** Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J.Clin.Invest.* 2005; **115**:1616–1626.
174. **Knieke K, Lingel H, Chamaon K, Brunner-Weinzierl MC.** Migration of Th1 lymphocytes is regulated by CD152 (CTLA-4)-mediated signaling via PI3 kinase-dependent Akt activation. *PLoS.One.* 2012; **7**:e31391.
175. **Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, et al.** Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2011; **12**:255–263.
176. **Berg RE, Cordes CJ, Forman J.** Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur.J.Immunol.* 2002; **32**:2807–2816.
177. **Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, Powrie F.** Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity.* 2010; **33**:279–288.
178. **Neurath MF.** New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal.Immunol.* 2014; **7**:6–19.
179. **Shi LZ, Fu T, Guan B, Chen J, Blando JM, Allison JP, Xiong L, et al.** Interdependent IL-7 and IFN- γ signalling in T-cell controls tumour eradication by combined α -CTLA-4+ α -PD-1 therapy. *Nat. Commun.* 2016; **7**.

-
180. **Flores-Santibáñez F, Cuadra B, Fernández D, Roseblatt M V., Núñez S, Cruz P, Gálvez-Cancino F, et al.** In vitro-generated Tc17 cells present a memory phenotype and serve as a reservoir of Tc1 cells in vivo. *Front. Immunol.* 2018; **9**:1–12.
181. **Rudolph M, Hebel K, Miyamura Y, Maverakis E, Brunner-Weinzierl MC.** Blockade of CTLA-4 decreases the generation of multifunctional memory CD4+ T cells in vivo. *J.Immunol.* 2011; **186**:5580–5589.
182. **Pedicord VA, Cross JR, Montalvo-Ortiz W, Miller ML, Allison JP.** Friends not foes: CTLA-4 blockade and mTOR inhibition cooperate during CD8+ T cell priming to promote memory formation and metabolic readiness. *J.Immunol.* 2015; **194**:2089–2098.
183. **Hemdan NY.** Anti-cancer versus cancer-promoting effects of the interleukin-17-producing T helper cells. *Immunol.Lett.* 2012; **149**:123–133.
184. **Ye J, Livergood RS, Peng G.** The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *Am.J.Pathol.* 2012; **182**:10–20.
185. **Murugaiyan G, Saha B.** Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J.Immunol.* 2009; **183**:4169–4175.
186. **Wilde S, Sommermeyer D, Leisegang M, Frankenberger B, Mosetter B, Uckert W, Schendel DJ.** Human antitumor CD8+ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition. *J.Immunol.* 2012; **189**:598–605.
187. **Dos Santos LI, Galvao-Filho B, de Faria PC, Junqueira C, Dutra MS, Teixeira SM, Rodrigues MM, et al.** Blockade of CTLA-4 promotes the development of effector CD8+ T lymphocytes and the therapeutic effect of vaccination with an attenuated protozoan expressing NY-ESO-1. *Cancer Immunol.Immunother.* 2015; **64**:311–323.
188. **Shi L, Meng T, Zhao Z, Han J, Zhang W, Gao F, Cai J.** CRISPR knock out CTLA-4 enhances the anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Gene.* 2017; **636**:36–41.
189. **Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D, Welters MJ, et al.** Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Sci.Transl.Med.* 2014; **6**:254ra128.
190. **Pentcheva-Hoang T, Simpson TR, Montalvo-Ortiz W, Allison JP.** Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade enhances antitumor immunity by stimulating melanoma-specific T-cell motility. *Cancer Immunol.Res.* 2014; **2**:970–980.
191. **Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang NAAS, Andrews MC, Sharma P, et al.** Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell.* 2017; **170**:1120–1133.
192. **Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA.** Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009; **114**:1537–1544.
193. **Herrmann A, Priceman SJ, Swiderski P, Kujawski M, Xin H, Cherryholmes GA, Zhang W, et al.** CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells. *J.Clin.Invest.* 2014; **124**:2977–2987.
194. **Kujawski M, Zhang C, Herrmann A, Reckamp K, Scuto A, Jensen M, Deng J, et al.** Targeting

STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their in vivo expansion and antitumor effects. *Cancer Res.* 2010; **70**:9599–9610.

195. **Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP.** Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J.Exp.Med.* 2009; **206**:1717–1725.

196. **Quezada SA, Peggs KS, Curran MA, Allison JP.** CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J.Clin.Invest.* 2006; **116**:1935–1945.

197. **Kalia V, Penny LA, Yuzefpolskiy Y, Baumann FM, Sarkar S.** Quiescence of Memory CD8(+) T Cells Is Mediated by Regulatory T Cells through Inhibitory Receptor CTLA-4. *Immunity.* 2015; **42**:1116–1129.

198. **Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, et al.** Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J.Exp.Med.* 2013; **210**:1695–1710.

199. **Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Scutti J, Vence L, Wargo J, Allison JP, et al.** Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3(+) Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers. *Clin. Cancer Res.* 2019; **25**:1233–1238.

200. **Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, Chmielowski B, et al.** PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014; **515**:568–571.

201. **Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP.** Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J. Exp. Med.* 2014; **211**:715–725.

202. **Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ.** Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015; **75**:2139–2145.

203. **Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, Rusakiewicz S, et al.** Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science (80-.).* 2015; **350**:1079–1084.

204. **Ruocco MG, Pilonis KA, Kawashima N, Cammer M, Huang J, Babb JS, Liu M, et al.** Suppressing T cell motility induced by anti-CTLA-4 monotherapy improves antitumor effects. *J.Clin.Invest.* 2012; **122**:3718–3730.

205. **Roh W, Chen PL, Reuben A, Spencer CN, Prieto PA, Miller JP, Gopalakrishnan V, et al.** Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci. Transl. Med.* 2017; **9**:1.

206. **Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, et al.** Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science (80-.).* 2015; **350**:207–211.

207. **Gao J, Shi LZ, Zhao H, Chen J, Xiong L, He Q, Chen T, et al.** Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell.* 2016; **167**:397–404.

208. **Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, Cucolo L, et al.** Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell.* 2016;

167:1540–1554.

209. **Zhu J, Powis De Tenbossche CG, Cané S, Colau D, Van Baren N, Lurquin C, Schmitt-Verhulst AM, et al.** Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nat. Commun.* 2017; **8**.

210. **Huang R-Y, Francois A, McGray AR, Miliotto A, Odunsi K.** Compensatory upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer. *Oncoimmunology.* 2017; **6**:e1249561.

211. **Shi LZ, Goswami S, Fu T, Guan B, Chen J, Xiong L, Zhang J, et al.** Blockade of CTLA-4 and PD-1 enhances adoptive t-cell therapy efficacy in an ICOS-mediated manner. *Cancer Immunol. Res.* 2019; **7**:1803–1812.

212. **Nelson MH, Kundimi S, Bowers JS, Rogers CE, Huff LW, Schwartz KM, Thyagarajan K, et al.** The inducible costimulator augments Tc17 cell responses to self and tumor tissue. *J.Immunol.* 2015; **194**:1737–1747.

213. **Ascierto PA, Kalos M, Schaer DA, Callahan MK, Wolchok JD.** Biomarkers for immunostimulatory monoclonal antibodies in combination strategies for melanoma and other tumor types. *Clin.Cancer Res.* 2013; **19**:1009–1020.

214. **Auslander N, Zhang G, Lee JS, Frederick DT, Miao B, Moll T, Tian T, et al.** Robust prediction of response to immune checkpoint blockade therapy in metastatic melanoma. *Nat. Med.* 2018; **24**:1545–1549.

215. **McArthur GA, Mohr P, Ascierto PA, Arance A, Banos Hernaez A, Kaskel P, Weichenthal M, et al.** Health Care Resource Utilization and Associated Costs Among Metastatic Cutaneous Melanoma Patients Treated with Ipilimumab (INTUITION Study). *Oncologist.* 2017; **22**:951–962.

216. **Hinrichs CS, Rosenberg SA.** Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol. Rev.* 2014; **257**:56–71.

217. **Mahvi DA, Meyers J V, Tatar AJ, Contreras A, Suresh M, Levenson GE, Sen S, et al.** Ctl-4 blockade plus adoptive T-cell transfer promotes optimal melanoma immunity in mice. *J. Immunother.* 2015; **38**:54–61.

218. **Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, et al.** Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2018; **378**:439–448.

219. **Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM.** CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu. Rev. Med.* 2017; **68**:139–152.

220. **Simon B, Harrer DC, Schuler-Thurner B, Schaft N, Schuler G, Dorrie J, Uslu U.** The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Exp. Dermatol.* 2018; **27**:769–778.

221. **Schultz L, Mackall C.** Driving CAR T cell translation forward. *Sci. Transl. Med.* 2019; **11**:eaaw2127.

12 Danksagung

Ich möchte besonders Frau Prof. Dr. Monika Brunner-Weinzierl danken, die mir stets großes Vertrauen und Unterstützung bei meinem Forschungsvorhaben geschenkt hat und mir spannende Einblicke in die T-Zell-Immunologie und CTLA-4-Forschung ermöglicht hat. Ihre fachliche Anleitung war entscheidend für den Erfolg der Arbeit. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Aditya Arra für seinen tatkräftigen Einsatz für die gemeinsame Forschung und Publikationen, Herrn Dr. Kolja Hegel für seine thematische und praktische Einarbeitung in die CD8⁺ T-Zell-Immunologie und verwendete Methoden, sowie Frau Dr. Kathrin Hebel, Herrn Dr. Holger Lingel und Herrn Dr. Michael Steiner für wichtige inhaltliche Diskussionen und Unterstützung. Ein großes Dankeschön an das gesamte Laborteam, insbesondere Frau Beatrix Kramer und Frau Kathrin Kramer für Ihre tägliche Unterstützung im Labor. Die In-vivo-Versuche wären ohne die Hilfe und sehr gute Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dirk Schlüter, Institut für Medizinische Mikrobiologie, nicht möglich gewesen. Ein besonderer Dank gilt dabei auch Herrn Dr. Nishanth Gopala für seine Unterstützung und Hilfe im Rahmen der Infektionsversuche. Dank schulde ich auch allen anderen Kollegen (unter anderem Herrn Dr. Roland Hartig, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie Magdeburg), die an den Arbeiten für die Dissertation und Publikationen in jeder Form beteiligt gewesen sind. Des Weiteren einen großen Dank an meine Familie und meine Verlobte Maike Winters für die langjährige Unterstützung jeglicher Art und ihren Zuspruch. Einen besonderen Dank schulde ich auch meinem Kollegen und Studienfreund Herrn Dr. Philipp Klinsmann für das Korrekturlesen der Dissertation. Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg, insbesondere dem Referat für Forschung, für die Förderung meines Forschungsprojektes im Rahmen der Doktorandenförderung danken. Die wissenschaftlichen Erfahrungen, die ich im Rahmen des spannenden Forschungsprojektes sammeln durfte, werden für meine zukünftige klinische und wissenschaftliche Tätigkeit von großem Wert sein.

Vielen Dank!

13 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Bedeutung von CTLA4 für IL-17-bildende CD8⁺ T-Zellen“

in der Kinderklinik der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Abteilung für Pädiatrische Immunologie, mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Monika Brunner-Weinzierl ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ergebnisse und Abbildungen (Originale oder in abgewandelter Form) aus den gemeinsamen Publikationen [148],[150], die hauptsächlich auf den Arbeiten und Daten von Herrn Aditya Arra basieren, wurden als solche in den entsprechenden Passagen gekennzeichnet und mit Einverständnis von Herrn Arra abgebildet.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 10.03.2020

Unterschrift

14 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

15 Anlagen

1. Primersequenzen für RT-PCR:

HPRT	Forward: 5'-CTC CTC AGA CCG CTT TTT GC-3' Reverse : 5'-AAC CTG GTT CAT CAT CGC TAA TC-3'
T-bet	Forward: 5'-TCA GGA CTA GGC GAA GGA GA-3' Reverse : 5'-TAG TGG GCA CCT TCC AAT TC-3'
Eomes	Forward: 5'-TGATAGTGTTGCAGTCTCTG-3' Reverse : 5'-CAATCTGATGGGATGAATCG-3'
SOCS3	Forward: 5'-GTT GAG CGT CAA GAC CCA GT-3' Reverse : 5'-GGG TGG CAA AGA AAA GGA GG-3'
SOCS1	Forward: 5'-CGC CAA CGG AAC TGC TTC TTC-3' Reverse : 5'-TCA GGT AGT CAC GGA GTA CC-3'
ROR α	Forward: 5'-TCT CCC TGC GCT CTC CGC AC-3' Reverse : 5'-TCC ACA GAT CTT GCA TGG A-3'
ROR γ	Forward: 5'-TGC AAG ACT CAT CGA CAA GG-3' Reverse : 5'-AGG GGA TTC AAC ATC AGT GC-3'
AhR	Forward: 5'-ACC AGA ACT GTG AGG GTT GG-3' Reverse : 5'-TCT GAG GTG CCT GAA CTC CT-3'
Runx-1	Forward: 5'-GAA GAA CCA GGT AGC GAG ATT CAA C-3' Reverse : 5'-TGG CGG ATT TGT AAA GAC GG-3'
IRF-4	Forward: 5'-TCT TCA AGG CTT GGG CAT TG-3' Reverse : 5'-CAC ATC GTA ATC TTG TCT TCC AAG TAG-3'
IL-23R	Forward: 5'-TGA AAG AGA CCC TAC ATC CCT TGA-3' Reverse : 5'-CAG AAA ATT GGA AGT TGG GAT ATG TT-3'
IL-21	Forward: 5'-CAT CAT TGA CCT CGT GGC CC-3' Reverse : 5'-ATC GTA CTT CTC CAC TTG CAA TCC C-3'
IL-17F	Forward: 5'-CTC CAG AAG GCC CTC AGA CTA-3' Reverse : 5'-AGC TTT CCC TCC GCA TTG ACA-3'
IL-17A	Forward: 5'-CCC ATG GGA TTA CAA CAT CAC-3' Reverse : 5'-CAC TGG GCC TCA GCG ATC-3'