

CTLA-4-induzierte Signaltransduktion bei der Differenzierung
von CD8⁺ T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologe Holger Lingel

geb. am 17.05.1982 in Wurzen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Monika C. Brunner-Weinzierl
Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Kalinke

eingereicht am: 26.09.2017

verteidigt am: 20.02.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die Reifung und Immunantwort von T-Lymphozyten	2
1.1.2	T-Zell-vermittelte Reaktionen	3
1.2	Die Aktivierung und Differenzierung von naiven CD8 ⁺ T-Zellen.....	4
1.2.1	Signale zur Aktivierung und Differenzierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	6
1.2.2	T-Zellrezeptor-vermittelte Signaltransduktion.....	9
1.2.3	Kostimulatorische und inhibitorische Rezeptoren auf CD8 ⁺ T-Zellen.....	10
1.2.4	Interaktionen zwischen kostimulatorischen und -inhibitorischen Molekülen.	13
1.2.5	Zytokinrezeptor-vermittelte Signale in CD8 ⁺ T-Zellen	14
1.2.6	Phasen der CD8 ⁺ T-Zellaktivierung.....	15
1.3	Die Rolle von CTLA-4 im Immunsystem	15
1.3.1	Die Regulation der CTLA-4 Expression	16
1.3.2	Die Funktionsweisen von CTLA-4 und dessen Blockade bei der Tumorthherapie.....	17
1.4	Zielstellung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Mauslinien.....	22
2.1.2	Zellen und Zelllinien	22
2.1.3	Antikörper	22
2.1.4	Chemikalien und Kits	24
2.1.5	Feinchemikalien und Oligonukleotide	26
2.1.6	Medien, Lösungen und Puffer.....	27
2.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien	28
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Mausgenotypisierung.....	30
2.2.2	Gewinnung von CD8 ⁺ T-Zellen und APZ aus Milz und Lymphknoten	31
2.2.3	CFSE Markierung von CD8 ⁺ T-Zellen zur Bestimmung der Proliferation	32
2.2.4	TAT-Cre Transduktion von CD8 ⁺ T-Zellen	32
2.2.5	Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	32
2.2.6	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von Tumorzelllinien.....	34

2.2.7	Experimentelle Tumormodelle	34
2.2.8	Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen	35
2.2.9	Durchflusszytometrische Analyse von intrazellulären Molekülen	36
2.2.10	iTRAQ Massenspektrometrie	37
2.2.11	Immunpräzipitation von Proteinen.....	38
2.2.12	Gewinnung von CD8 ⁺ T-Zelllysaten für Western Blot	38
2.2.13	Detektion von Proteinen mittels Western Blot	39
2.2.14	Gewinnung von RNA und cDNA	40
2.2.15	Quantitative PCR-Analyse	40
2.2.16	Next Generation Sequencing	40
2.2.17	Statistische Analyse der Daten	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Der Einfluss von CTLA-4-vermittelten Signalen auf CD8 ⁺ T-Zellen	42
3.1.1	Agonistische CTLA-4 Signale bewirken eine spezifische Reduktion der IFN- γ -Produktion.....	42
3.1.2	Die Aktivierung von CTLA-4 löst definierte Änderungen innerhalb des Phosphoproteoms von CD8 ⁺ T-Zellen aus.....	46
3.1.3	Der Transkriptionsfaktor Fos-related Antigen 2 (Fra-2, <i>Fos/2</i>) wird durch CTLA-4-Aktivierung dephosphoryliert	49
3.1.4	Die CTLA-4-vermittelte Induktion von Programmed cell death-4 (PDCD4) führt zur Kontrolle der Proteintranslation.....	52
3.2	Die Bedeutung von PDCD4 für die CD8 ⁺ T-Zell-vermittelte und anti-tumorale Immunantwort	54
3.2.1	Die CTLA-4-vermittelte PDCD4 Induktion führt zu einer reduzierten IFN- γ -Produktion in antigen-spezifisch aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen	54
3.2.2	Eine PDCD4 Defizienz verbessert die Kontrolle des Tumorwachstums in experimentellen Tiermodellen	57
3.3	Der CTLA-4-vermittelte Mechanismus der PDCD4 Induktion	61
3.3.1	Die Aktivierung von CTLA-4 bewirkt eine Erhöhung von <i>Pdcd4</i> mRNA.....	61
3.3.2	Die Induktion von PDCD4 ist von der Reaktivierung des Transkriptionsfaktors Forkhead box protein O1 (FoxO1) abhängig	63
3.4	PDCD4 reguliert die Translation spezifischer mRNAs in CD8 ⁺ T-Zellen.....	68

4	Diskussion	71
4.1	CTLA-4-vermittelte Mechanismen wirken auf regulatorische Faktoren der CD8 ⁺ T-Zelldifferenzierung	71
4.2	CTLA-4 Signale führen zu definierten Änderungen bei der Proteinphosphorylierung in CD8 ⁺ T-Zellen.....	74
4.3	Das CTLA-4 Zielprotein PDCD4 spielt eine wichtige Rolle bei anti-tumoralen Immunantworten	75
4.4	Ausblick	79
5	Zusammenfassung / Abstract	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Abkürzungsverzeichnis	95
8	Anlagen	97
10	Danksagungen.....	100
11	Selbständigkeitserklärung.....	101

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aktivierungssignale für naive CD8 ⁺ T-Zellen.	7
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung von T-Zellrezeptor-vermittelten Signalwegen.	9
Abb. 3: Kostimulatorische und -inhibitorische Moleküle mit ihren Liganden.	11
Abb. 4: CTLA-4-abhängige Mechanismen und der Effekt einer CTLA-4 Blockade....	18
Abb. 5: Übersicht über die angewandten Differenzierungssysteme für CD8 ⁺ T-Zellen.	33
Abb. 6: Die Expression von CTLA-4 auf polyklonal aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen.	42
Abb. 7: CTLA-4-vermittelte Signale bewirken eine spezifische Reduktion der IFN- γ - Produktion in differenzierenden CD8 ⁺ T-Zellen.....	43
Abb. 8: CTLA-4-induzierte Mechanismen führen auf aktivierten CD44 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen zu einer erhöhten Re-Expression von CD62L.....	44
Abb. 9: CTLA-4 vermittelt keinen Einfluss auf die Expression von T-bet und Eomes während der primären Aktivierung.	45
Abb. 10: Der Einfluss von CTLA-4 auf die IL-12- und IFN- γ -Rezeptor Expression.	46
Abb. 11: CTLA-4-induzierte Änderungen im Phosphoproteom von CD8 ⁺ T-Zellen. ..	47
Abb. 12: CTLA-4-vermittelte Änderungen betreffen ein Netzwerk von Proteinen.	48
Abb. 13: CTLA-4 vermittelt die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors Fra-2.	49
Abb. 14: Der Gehalt an <i>Fos/2</i> (Fra-2) mRNA ist von CTLA-4 unbeeinflusst.	50
Abb. 15: Die Phosphorylierung von Fra-2 erfolgt unter Beteiligung von PKA.	51
Abb. 16: Der Translationsinhibitor PDCD4 wird durch CTLA-4-Aktivierung induziert.	53
Abb. 17: CTLA-4-induziertes PDCD4 inhibiert die Translationsinitiation.	54
Abb. 18: CTLA-4-defiziente CD8 ⁺ T-Zellen sind in der Expression von PDCD4 beeinträchtigt.	55
Abb. 19: PDCD4-defiziente Zellen weisen eine erhöhte Produktion von IFN- γ auf....	56
Abb. 20: PDCD4-defiziente CD8 ⁺ T-Zellen verlangsamen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen.	58
Abb. 21: Periphere transferierte PDCD4-defiziente CD8 ⁺ T-Zellen zeigen eine erhöhte IFN- γ -Produktion.....	59

Abb. 22: Das systemische Fehlen von PDCD4 begünstigt die Tumorabstoßung von transplantierten Prostatakarzinomzellen.	60
Abb. 23: Die CTLA-4-vermittelte PDCD4 Induktion erfolgt unabhängig von der Proteindegradation.	61
Abb. 24: CTLA-4 induziert PDCD4 durch Erhöhung der Genexpression.....	62
Abb. 25: Die Inhibition von FoxO1 unterbindet die CTLA-4-abhängige Induktion von PDCD4.....	63
Abb. 26: Die Deletion von <i>Foxo1</i> führt zu einer verringerten PDCD4 Expression.	64
Abb. 27: Das FoxO1 Zielgen <i>Tcf7</i> (TCF-1) wird durch CTLA-4 induziert.....	65
Abb. 28: CTLA-4-vermittelte Signale bewirken eine Reaktivierung von FoxO1.	66
Abb. 29: Die CTLA-4-induzierte Reaktivierung von FoxO1 wird durch PKC vermittelt.	67
Abb. 30: PDCD4-gebundene RNAs in CD8 ⁺ T-Zellen.	68
Abb. 31: PDCD4 inhibiert die Translation des Enzyms Glutaminase (<i>Gls</i>).	69
Abb. 32: Exogenes Glutamat erhöht die IFN- γ -Produktion in WT CD8 ⁺ T-Zellen.	70

Anlagenverzeichnis

Anlage 1: Durch CTLA-4 regulierte Phosphorylierungsstellen in CD8 ⁺ T-Zellen.	97
Anlage 2: Signifikant angereicherte GO:BP Kategorien von CTLA-4-regulierten Proteinen.	98
Anlage 3: Von PDCD4 gebundene RNA Moleküle in CD8 ⁺ T-Zellen.	99

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein überlebensnotwendiger, interaktiver Schutzmechanismus des Körpers, bestehend aus einem Netzwerk von lymphatischen Organen, Zellen, Zytokinen und weiteren immunologischen Molekülen. Es entfaltet seine Wirkung nicht nur auf äußere Antigene, wie z.B. Pathogene oder Toxine, sondern kann auch gegen körpereigene Strukturen gerichtet sein. Die Möglichkeit der Eigenerkennung ist notwendig, um infizierte und entartete Zellen zu beseitigen. Im Gegenzug erfordert die Selbstreaktivität des Immunsystems eine Regulation durch sogenannte Toleranzmechanismen, um gewebeschädigende Immunantworten zu vermeiden. Dieses Verhältnis spielt vor allem bei chronischen Virus- und Krebserkrankungen eine kritische Rolle.

Die Immunantwort kann anhand ihrer Reaktionszeit und ihrer Möglichkeit zur Gedächtnisbildung in die angeborene und adaptive Immunität unterteilt werden. Die angeborene Immunität umfasst zelluläre und humorale Bestandteile, wie z.B. Dendritische Zellen, Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen sowie Komponenten des Komplementsystems oder Akute-Phase-Proteine. Diese können kein immunologisches Gedächtnis anlegen und reagieren durch unmittelbar ausführbare Mechanismen, welche auf festgelegte Rezeptoren gegen allgemeine Erkennungsmerkmale basieren. Z.B. erfolgt die Detektion von mikrobiellen Infektionen durch Toll-like-Rezeptoren (TLR), welche u.a. bakterielle Zellwandbestandteile erkennen können ([Brubaker et al., 2015](#)). Die Mechanismen der angeborenen Immunantwort spielen eine kritische Rolle für die schnelle Erfassung und Abwehr von Pathogenen sowie für die Initiation einer proinflammatorischen Antwort. Die resultierende Entzündungsreaktion dient sowohl zur Eindämmung von Infektionen als auch zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort.

Die adaptive Immunantwort wird durch B- und T-Lymphozyten vermittelt und tritt zeitlich verzögert ein, wenn der Schutz durch die angeborene Immunität nicht ausreicht. Lymphozyten können in einer maßgeschneiderten Reaktion gegen individuelle Antigene klonal expandieren und ein immunologisches Gedächtnis

ausbilden. NKT-Zellen nehmen innerhalb der beiden Kategorien der Immunantwort eine Zwischenstellung ein. Diese Zellen können nach Erkennung von spezifischen Lipid-basierten sowie hydrophoben Antigenen durch eine schnelle Zytokinproduktion weitere Zellen des Immunsystems regulieren (Cohen et al., 2013; Pennock et al., 2013).

1.1.1 Die Reifung und Immunantwort von T-Lymphozyten

Die Population der T-Lymphozyten kann mehr als 10 Billionen verschiedene Antigen-erkennende T-Zellrezeptoren ausprägen. Diese enorme Rezeptordiversität ist die Grundlage für deren spezifische Reaktion und entsteht bei der Lymphozytenreifung durch somatische Rekombination von multiplen Genanordnungen. Während B-Zellen ihre Entwicklung vollständig im Knochenmark vollziehen, verlassen Vorläuferzellen von T-Lymphozyten dieses, um im Thymus von Thymozyten zu T-Zellen zu reifen. Im Thymus finden die Prozesse der positiven und negativen Selektion statt. Die positive Selektion dient zur Sicherstellung der Funktionsfähigkeit des T-Zellrezeptors (TZR), damit spätere T-Lymphozyten eine adäquate Immunantwort ausführen können. Die negative Selektion ist ein Prozess der zentralen Toleranz, bei dem selbstreaktive Vorläuferzellen durch programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert werden. Des Weiteren können sich Thymozyten mit erhöhter Affinität gegenüber Selbstantigenen zu immunsupprimierenden regulatorischen T-Zellen entwickeln (Hsieh et al., 2012).

Nach ihrer Reifung verlassen die Thymozyten den Thymus, um in einem zunächst ruhenden Zustand als sogenannte naive T-Zellen in die Peripherie auszuwandern und fortlaufend durch Blut sowie sekundäre lymphatische Organe zu zirkulieren. Der Übergang vom naiven Zustand in eine aktivierte Form wird durch die Bindung des TZR an Antigen-MHC-Molekülkomplexe auf professionellen Antigen-präsentierende Zellen (APZ) vermittelt. APZ, wie z.B. Dendritische Zellen, sind eine heterogene Zellpopulation, welche körpereigene und -fremde Antigene durch Phagozytose aufnehmen und danach prozessieren sowie präsentieren können. Diese Zellen unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und Migration sowie in ihrer Abhängigkeit von inflammatorischen Signalen. Konventionelle Dendritische Zellen können z.B. in lymphatischen Organen residieren und benötigen keine entzündliche Umgebung, um eine Antigen-präsentierende Funktion auszuüben. Migratorische Dendritische Zellen

können dagegen im peripherem Gewebe Antigene aufnehmen und danach in den ableitenden Lymphknoten einwandern ([Shortman und Naik, 2007](#)).

Die T-Zellaktivierung kann eine klonale Expansion auslösen, welche zu einer bis zu 10^5 -fachen Erhöhung der Anzahl an Antigen-spezifischen Zellen führt. Im Gegensatz zu Antikörper-produzierenden B-Zellen, modulieren aktivierte T-Zellen die Immunantwort und führen die Zell-vermittelte Reaktion des adaptiven Immunsystems aus. Eine effektive Aktivierung von Lymphozyten resultiert in der Bildung einer heterogenen Zellpopulation, bei welcher Effektorzellen ihre Funktion z.B. durch zytotoxische Aktivität oder die Produktion von Zytokinen ausführen. Die meisten T-Zellen werden am Ende einer Immunantwort durch Apoptose beseitigt. Ein Teil der Zellen kann diese Kontraktionsphase überstehen und ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Bei erneutem Antigenkontakt kann dadurch eine schnellere, stärkere und daher meist symptomfreie Immunreaktion ausgeführt werden ([Mueller et al., 2013](#); [Pennock et al., 2013](#)).

Die Kontrolle der adaptiven Immunantwort erfolgt durch komplexe Mechanismen, wie z.B. die Aufteilung von Aktivierungssignalen, die Expression von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren oder die suppressive Wirkung von regulatorischen T-Zellen. Diese Mechanismen dienen sowohl der Ausführung einer effektiven Immunantwort als auch dem Schutz vor Immunreaktionen gegenüber körpereigene Strukturen ([Liu et al., 2016](#)).

1.1.2 T-Zell-vermittelte Reaktionen

Der Hauptteil der T-Zellen ist durch die Expression eines $\alpha\beta$ T-Zellrezeptors charakterisiert. Dieser ist primär für die Erkennung von Peptidantigenen ausgelegt, welche über MHC-I und -II Moleküle auf APZ präsentiert werden. Während T-Helferzellen mit Hilfe des CD4 Corezeptors auf Antigen-MHC-II Komplexe reagieren, können $CD8^+$ T-Zellen durch die Expression des CD8 Corezeptors über MHC-I-präsentierte Antigene aktiviert werden. T-Helferzellen spielen eine zentrale Rolle für verschiedene Funktionen des Immunsystems. Sie beeinflussen die Antikörperproduktion von B-Zellen, unterstützen $CD8^+$ T-Zell-vermittelte Reaktionen, regulieren die Funktion von APZ und können die adaptive Immunantwort supprimieren. Im Laufe ihrer Aktivierung können $CD4^+$ T-Zellen zu verschiedenen T-

Zellsubpopulationen differenzieren. Die Subpopulationen umfassen u.a. Th1-, Th2-, Th9- oder Th17-Zellen sowie induzierbare regulatorische Zellen (iTreg) und weisen eine Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren auf. Z.B. hat der Transkriptionsfaktor FoxP3 eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen (Lu et al., 2017; Zhu et al., 2010).

CD8⁺ T-Zellen können nach ihrer Aktivierung zu Zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) differenzieren. Diese exprimieren hohe Mengen an sekretorischen zytotoxischen Vesikeln und Zytokinen, wie z.B. Interferon- γ (IFN- γ) (Araujo-Souza et al., 2015). Ihre Zytotoxizität vermitteln CTL durch eine regulierte Exozytose dieser Vesikel in Richtung der Zielzellen bzw. durch die Freisetzung der darin enthaltenen Porenformenden Proteine und spezifische Serinproteasen. Diese Effektormoleküle, wie z.B. Perforin-1 oder Granzym B, sind in der Lage, in den Zielzellen den Vorgang der Apoptose auszulösen (Lopez et al., 2012). Nahezu alle körpereigenen Zellen können endogene Antigene über MHC-I Moleküle präsentieren, wodurch diese von CTL erkannt und eliminiert werden können. Aus diesem Grund sind CD8⁺ T-Zellen bei der Immunantwort gegenüber Virusinfektionen und Tumorzellen von essentieller Bedeutung (Hadrup et al., 2013; Kilinc et al., 2009).

1.2 Die Aktivierung und Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen

Die Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Lymphozyten erfolgt durch Integration von multiplen Signalen, welche in Form von Ligand-Rezeptor-Interaktionen übermittelt werden. Innerhalb der T-Zellen wird durch die Rezeptoraktivierungen ein komplexes Netzwerk von intrazellulären Signalwegen ausgelöst, welche vor allem in der Implementierung von spezifischen Genexpressionsprofilen resultieren. Die Expression von Genen kann auf unterschiedliche Weise reguliert sein. Einerseits erfolgt eine Kontrolle auf der Stufe der Gentranskription z.B. durch gezielte Expression von zellspezifischen Transkriptionsfaktoren. Aktivierende Transkriptionsfaktoren in CD8⁺ T-Zellen sind u.a. T-bet, Eomes oder Runx2. Die maximale Anzahl der im Vergleich zu naiven CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich vorliegenden Transkripte wird bereits nach 48 h erreicht (Best et al., 2013).

Neben der gezielten Transkription von Genen werden die Aktivierung, Plastizität und Toleranz von Immunzellen auch andererseits durch post-transkriptionale Mechanismen kontrolliert, welche sowohl das Spleißen, die Stabilität bzw. den Abbau von Transkripten als auch deren Translation zu Proteinen regulieren. Des Weiteren erfolgt auf Proteinebene eine post-translationale Regulation durch Modifikationen bzw. durch den gezielten Abbau von Proteinen. Die post-transkriptionale Kontrolle wird dabei durch nicht-codierende RNA Moleküle, wie z.B. micro-RNA sowie durch RNA-bindende Proteine ausgeführt. Micro-RNAs leiten Ribonukleoproteinkomplexe über komplementäre Basenpaarung zu Ziel-mRNAs, um deren Translation zu inhibieren bzw. um deren Degradation zu bewirken. In CD8⁺ T-Zellen sind die micro-RNA 16, 21 und 142-3p prädominant exprimiert. Während miR-16 und miR-142-3p in Effektorzellen eine geringere Konzentration als in ruhenden T-Zellen aufweisen, ist miR-21 in Effektorzellen am stärksten exprimiert ([Bronevetsky und Ansel, 2013](#); [Wu et al., 2007](#)).

Die Regulation der mRNA-Translation erfolgt vorrangig auf der Stufe der Translationsinitiation, bei welcher die 40S ribosomale Untereinheit zur 5'-terminalen „Cap“-Struktur der mRNA rekrutiert wird. Dieser Schritt wird durch die koordinierte Bindung von verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren (eIF) vermittelt und ist ein zentraler Teil der Kontrolle durch den „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) Signalweg. Die katalytische Untereinheit mTOR liegt in den zwei verschiedenen Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2 vor, wobei mTORC1 vor allem anabolische Prozesse für das Zellwachstum sowie die Proliferation und mTORC2 das Überleben von Zellen steuert. Die mTORC1-vermittelte Kontrolle der Translationsinitiation erfolgt u.a. über den eIF4E bzw. eIF4E-bindende Proteinen (4E-BPs) und die Zielproteine von S6-Kinasen (S6K). S6K können das ribosomale Protein S6, den Translationsinhibitor PDCD4 und den Faktor eIF4B regulieren ([Piccirillo et al., 2014](#)). Durch die bei einer T-Zellaktivierung ausgelösten anabolischen Prozesse besteht ein erhöhter Bedarf an metabolischen Intermediaten, welcher durch eine Umstellung des Zellstoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung zu aerober Glykolyse und Glutaminolyse gedeckt wird ([MacIver et al., 2013](#); [Wang et al., 2011](#)).

Die post-translationale Modifikation (PTM) ist ein biochemischer Mechanismus, bei dem Aminosäurereste eines Proteins kovalent modifiziert werden, wie z.B. durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Acetylierung. PTMs sind entscheidend für die Struktur, Lokalisation und Funktion von Proteinen, sowie für deren Halbwertszeit und Interaktionsmöglichkeiten. Die Modifikationen können die Eigenschaften von Proteinen in kürzester Zeit ändern und ermöglichen dadurch eine unmittelbare Informationsverarbeitung in Antwort auf extra- und intrazelluläre Signale. Für die Transduktion von Signalen, welche z.B. durch Aktivierung von Rezeptoren wie den TZR induziert werden, ist die reversible Proteinphosphorylierung die am häufigsten vorkommende PTM. Bei diesem Prozess katalysiert eine Proteinkinase den Transfer eines Phosphatrests von ATP auf ein Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest, während eine Proteinphosphatase die Phosphatreste von einem Protein entfernen kann ([Ubersax und Ferrell, JR, 2007](#)).

1.2.1 Signale zur Aktivierung und Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen

Für eine effektive Immunantwort bzw. zur vollständigen Aktivierung benötigen naive CD8⁺ T-Zellen eine Aktivierung durch eine Kombination von drei Signalen, vermittelt durch den TZR (Signal 1), durch Kostimulation (Signal 2) sowie durch inflammatorische Zytokine (Signal 3) ([Abb. 1](#)) ([Curtsinger und Mescher, 2010](#)). Die Erkennung des Antigen-MHC I-Komplex auf APZ durch den TZR ist notwendig, um die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung zu initiieren. Die TZR-Aktivierung allein ist jedoch nicht ausreichend, um eine Proliferation auszulösen ([Abb. 1A](#)). Das Aufeinandertreffen von APZ und naiven CD8⁺ T-Zellen findet in der Regel in den sekundären lymphatischen Organen statt. APZ, wie z.B. die dort residierenden konventionellen Dendritischen Zellen, können nicht nur die Aktivierung des TZR vermitteln, sondern auch konstitutiv den kostimulatorischen Liganden B7-2 (CD86) exprimieren. Dessen Rezeptor CD28 ist ebenso konstitutiv auf murinen T-Zellen und auf 50-80% der humanen T-Zellen vorhanden. Die Bindung von B7-Liganden durch CD28 liefert daher ein primäres kostimulatorisches Signal zur initialen T-Zellaktivierung ([Beyersdorf et al., 2015](#)). Des Weiteren erfolgt im Rahmen der T-Zellaktivierung bei der Ausbildung von Zellkontakten zu Dendritischen Zellen eine räumliche Reorganisation von Zelloberflächenmolekülen zu einer sogenannten immunologischen Synapse. Diese spezifische Anordnung von TZR und CD28

Molekülen ist eine Voraussetzung für eine effektive TZR- und CD28-vermittelte Aktivierung (Chen und Flies, 2013).

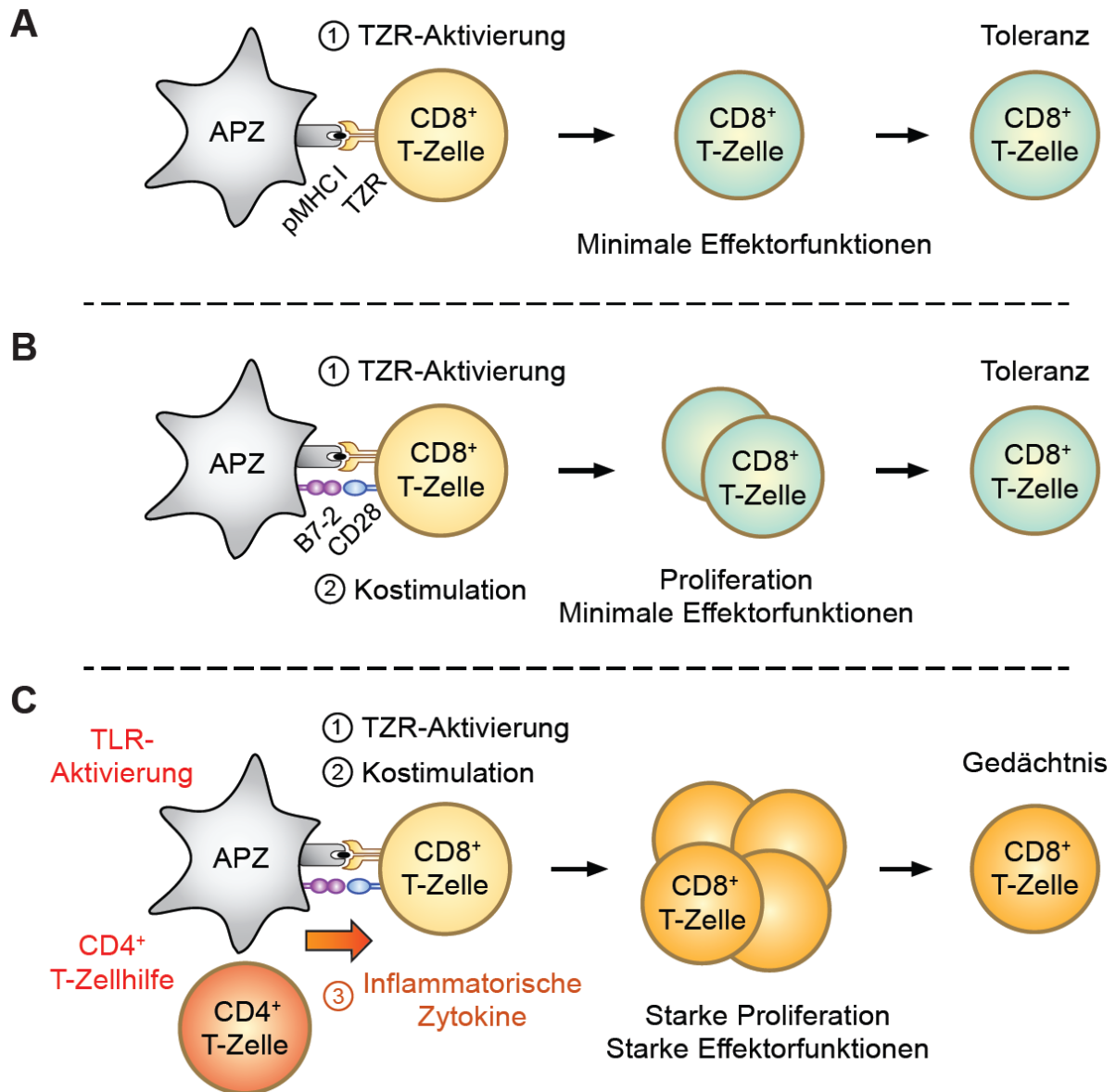


Abb. 1: Aktivierungssignale für naive CD8+ T-Zellen.

Naive CD8+ T-Zellen benötigen eine Kombination von drei verschiedenen Signalen zur vollständigen Aktivierung und Gedächtnisbildung. (A) Die alleinige Aktivierung durch den T-Zellrezeptor (TZR) (Signal 1) führt zu Toleranz und keiner Proliferation. (B) Co-stimulation (Signal 2) in Kombination mit TZR-Signalen ausgelöst durch unaktivierte APZ, resultiert in einer ineffektiven CD8+ T-Zellantwort und Toleranz. (C) Aktivierte APZ erhöhen ihre Expression von kostimulatorischen Liganden und schütten inflammatorische Zytokine (Signal 3), wie z.B. IL-12 oder Typ I-Interferone aus. Dadurch wird eine effektive CD8+ T-Zellantwort mit Gedächtnisbildung ermöglicht. Das dritte Signal kann durch Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf APZ und CD4+ T-Zellhilfe ausgelöst werden (abgeänderte Abbildung nach Curtsinger und Mescher, 2010; Mescher et al., 2006).

Die Kombination von TZR- und CD28-vermittelten Signalen löst ein Zellwachstum sowie eine Proliferation von CD8⁺ T-Zellen aus. Residierende konventionelle Dendritischen Zellen exprimieren jedoch in einem nichtaktivierten Zustand keine inflammatorischen Zytokine und nur geringe Mengen an MHC-Molekülen und B7-Liganden. Dadurch können diese APZ nur eine ineffektive CD8⁺ T-Zellantwort auslösen (Abb. 1B). Werden CD8⁺ T-Zellen unzureichend bzw. inadäquat aktiviert, führt dies zum Verlust der Reaktivität gegenüber weiterer Antigen-vermittelter Aktivierung wodurch es zur Ausbildung einer Toleranz kommt (Abb. 1A und B; Mescher et al., 2006). Werden jedoch APZ z.B. durch TLR-vermittelte Erkennung von pathogenen Strukturen oder durch CD40L/CD40-abhängige Interaktionen innerhalb einer CD4⁺ T-Zellhilfe aktiviert, erhöhen diese die Expression von kostimulatorischen Liganden und es kommt zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-12 oder IFN- α . Dadurch kann eine effektive und gedächtnisbildende CD8⁺ T-Zellantwort ausgelöst werden (Abb. 1C). Die Kombination der verschiedenen Aktivierungssignale ist ein wichtiger Mechanismus, um innerhalb des Immunsystems kontextabhängige Entscheidungen zu treffen, ob Antigene toleriert oder als gefährdet eingestuft werden sollen (Curtsinger und Mescher, 2010).

Ein weiterer Mechanismus der CD4⁺ T-Zellhilfe umfasst die Produktion des Zytokins IL-2. Dies ist u.a. notwendig um eine nach der CD8⁺ T-Zellaktivierung ausgelöste Anergie bzw. Nichtreaktivität zu vermeiden. Eine CD4⁺ T-Zellhilfe kann daher über verschiedene Mechanismen sowie zu verschiedenen Zeitpunkten während einer CD8⁺ T-Zellantwort erfolgen und ermöglicht eine sekundäre Expansion von CD8⁺ T-Zellen bzw. die Etablierung eines CD8⁺ T-Zellgedächtnisses (Mescher et al., 2006). CD8⁺ T-Gedächtniszellen sind eine heterogene Population, welche nach einem Modell zur Gedächtnisbildung anhand ihrer Effektorfunktionen sowie proliferativen und migratorischen Eigenschaften definiert werden können. Demnach exprimieren die sogenannten zentralen Gedächtniszellen die Oberflächenmoleküle CCR7 und CD62L (L-Selectin) und besitzen eine hohe proliferative Kapazität. Effektor-Gedächtniszellen zeigen dagegen keine CCR7 und CD62L Expression, sind weniger proliferativ, produzieren jedoch erhöhte Mengen an Effektormolekülen bzw. Zytokinen (Mueller et al., 2013; Sallusto et al., 1999).

1.2.2 T-Zellrezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Der $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor befindet sich in einer multimolekularen Verbindung mit den nicht variablen Signaltransduktionsuntereinheiten CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ und ζ -Ketten. Diese Untereinheiten enthalten in ihrem zytoplasmatischen Proteinabschnitt sogenannte Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAMs). Die Erkennung des Antigens durch den TZR verursacht eine Konformationsänderung des TZR-Komplexes, welche zu einer Exposition der Tyrosinreste der ITAMs führt. Die Proteinkinase Lck kann dadurch die ITAMs phosphorylieren (Abb. 2). Dieses Ereignis ermöglicht die Rekrutierung der Tyrosinkinase ZAP-70 (ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa) sowie deren Phosphorylierung bzw. Aktivierung durch Lck. Im weiteren Verlauf phosphoryliert die aktivierte Kinase ZAP-70 das Molekül LAT (Linker for activation of T cells), was zur Bildung eines intrazellulären Komplexes aus Signal- und Adaptermolekülen wie PLC- γ , ADAP, LAT, SLP-76 oder VAV führt.

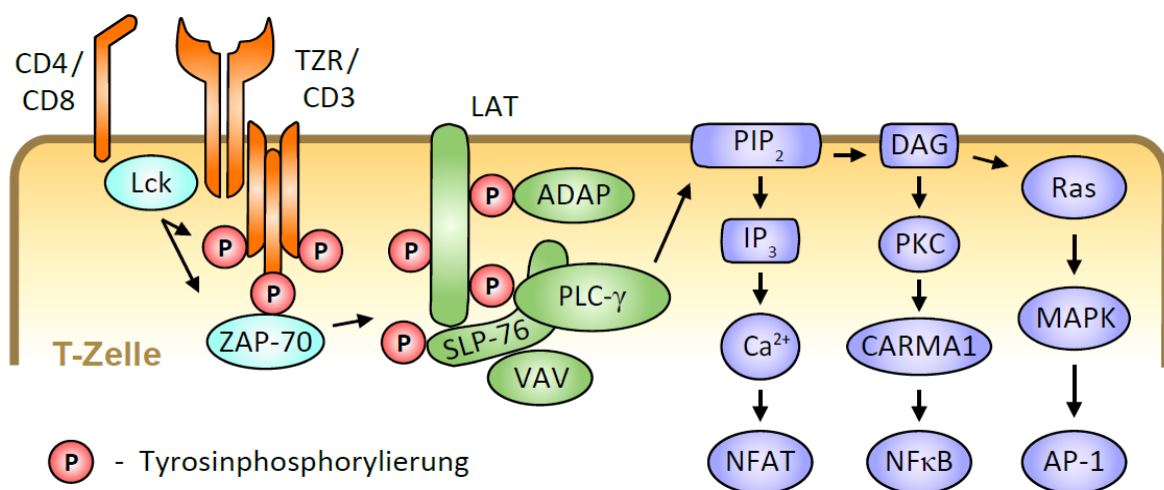


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung von T-Zellrezeptor-vermittelten Signalwegen.

Die T-Zellrezeptor (TZR)-vermittelte Signaltransduktion wird durch die Erkennung des passenden Antigens initiiert. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung führt zur Phosphorylierung der ITAMs des TZR/CD3 Komplexes durch die Proteinkinase Lck. Diese Phosphorylierungen führen zur Rekrutierung der Proteinkinase ZAP-70 sowie deren Phosphorylierung und Aktivierung durch Lck. ZAP-70 phosphoryliert im weiteren Verlauf die Adaptermoleküle LAT und SLP-76, was die Bildung eines Komplexes von Signalmolekülen ermöglicht, welcher u.a. die Aktivierung von wichtigen Transkriptionsfaktoren wie NFAT, NF κ B und AP-1 auslöst. ADAP, Adhesion and degranulating promoting adapter protein; AP-1, Activator protein 1; Ca²⁺, Kalziumionen; DAG, Diacylglycerin; IP₃, Inositol-(1,4,5)-trisphosphat; LAT, Linker for activated T cells, MAPK, Mitogen-activated protein kinase; NFAT, Nuclear factor of activated T cells; NF κ B, Nuclear Factor κ B; PIP₂, Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphosphat; PKC, Protein kinase C; PLC- γ , Phospholipase- γ ; ZAP-70, ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa (abgeänderte Abbildung nach [Brownlie und Zamoyska, 2013](#)).

Danach werden über verschiedene Reaktionen eine Reihe von primären Signalwegen ausgelöst. PLC- γ spaltet dabei membran-gebundenes PIP₂ in IP₃ und DAG auf, wobei IP₃ zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, welche die Translokation von NFAT Transkriptionsfaktoren in den Zellkern vermittelt. Weitere initiale Schritte sind die Aktivierung von Rho-GTPasen durch Guanin-Austaschfaktoren wie z.B. VAV oder Ras sowie die Aktivierung von Serin/Threoninkinasen der PKC-Familie durch DAG, welche zu einer Umstrukturierung des Zytoskellets und der Zellkontakte führen, bzw. über Signalmoleküle wie z.B. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen oder den CARMA1/Bcl10/MALT1-Komplex, welche die Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B regulieren (Abb. 2) (Brownlie und Zamoyska, 2013; Cronin und Penninger, 2007). Des Weiteren ist die Kombination der Transkriptionsfaktoren für deren Funktion von Bedeutung. So besteht z.B. der Faktor AP-1 als Dimer aus verschiedenen Molekülen der Jun-, Fos- oder ATF-Gruppe, oder so wirkt z.B. der Faktor NFAT in Abwesenheit von AP-1 inhibierend anstatt aktivierend (Martinez et al., 2015; Shaulian und Karin, 2002).

1.2.3 Kostimulatorische und inhibitorische Rezeptoren auf CD8⁺ T-Zellen

Kostimulatorische Signale sind neben der Erkennung des Antigens durch den TZR und dem Vorliegen von inflammatorischen Zytokinen für die vollständige Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen notwendig. CD8⁺ T-Zellen können jedoch nicht nur kostimulatorisch wirkende Rezeptoren, wie CD28, ICOS, 4-1BB, OX40, GITR, LIGHT oder CD27 exprimieren, sondern auch inhibitorische Rezeptoren, wie „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4“ (CTLA-4), PD-1, BTLA, TIM-3 oder CD160 aufweisen (Abb. 3). Das komplexe Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Signalen moduliert die T-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung von T-Zellen und ist entscheidend für die Regulation der Funktion bzw. der Differenzierung von T-Zellen (Chen und Flies, 2013; Zhu et al., 2011). Die Regulation von kostimulatorischen und inhibitorischen Signalen erfolgt durch eine zelltypspezifische Expression sowie durch die Modulation der Oberflächenverfügbarkeit von entsprechenden Liganden und Rezeptoren. Z.B. werden ICOS, 4-1BB, GITR, LIGHT und OX-40 erst nach der T-Zellaktivierung exprimiert, während die Rezeptoren CD27,

und CD28 auch auf naiven T-Zellen vorhanden sind. Daher vermitteln CD27 und CD28 die primären kostimulatorischen Signale für die initiale T-Zellaktivierung. Die Aktivierung von CD27 durch Bindung von CD70 auf APZ führt u.a. zur Erhöhung der Anzahl an Effektorzellen durch die Unterbindung von apoptotischen Prozessen. CD27 vermittelt Signale, die sowohl zur Erhöhung der Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL-XL führen, als auch der FasL-induzierten Apoptose entgegenwirken (van de Ven und Borst, 2015).

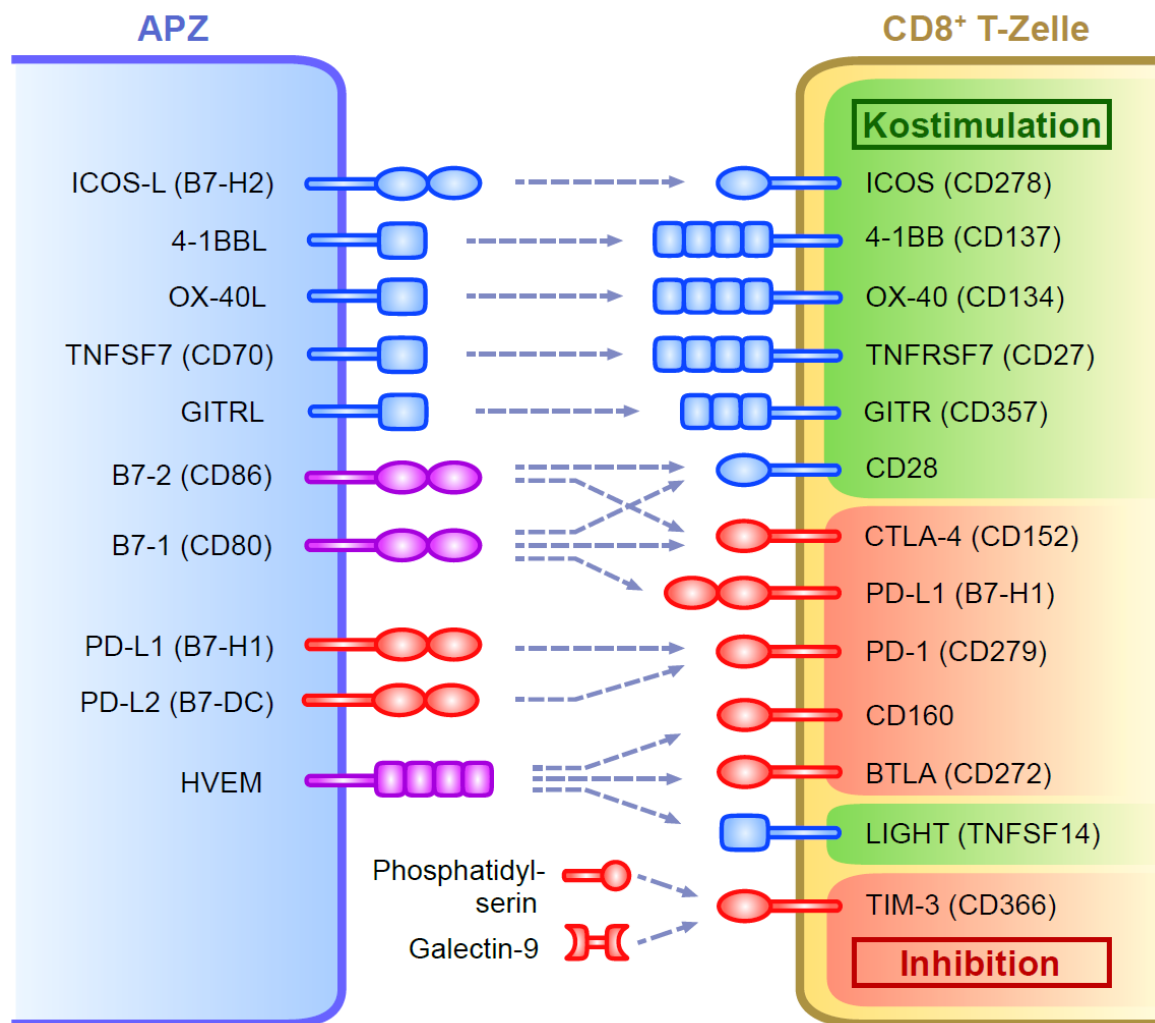


Abb. 3: Kostimulatorische und -inhibitorische Moleküle mit ihren Liganden.

Kostimulatorische Moleküle (blau) liefern aktivierende Signale für T-Zellen, während vorrangig inhibitorisch wirkende Moleküle (rot) Signale vermitteln, die einer Aktivierung von T-Zellen entgegenwirken. Mit den Liganden B7-1, B7-2 und HVEM (violett) können sowohl kostimulatorische als auch -inhibitorische Moleküle interagieren (abgeänderte Abbildung nach Baumeister et al., 2016 und Chen und Flies, 2013).

CD28 übt seine Funktion als Kostimulator über die Bindung von Signal- und Adaptermolekülen an dessen intrazellulären Motiven YNMN und PYAP aus. Die Motive können durch Src Kinasen phosphoryliert werden und die Anlagerung von Grb2, GADS, SLP76, PI3K und Lck vermitteln. Dies führt zum Einen zu einer synergistischen Verstärkung der TZR-vermittelten Aktivierung über VAV-, PKC θ - und MAPK-Signale (Boomer und Green, 2010). Andererseits führt eine Aktivierung der PI3K zur Bildung von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat, wodurch Proteine mit einer PH-Domäne, wie die Phosphoinosit-anhängige Kinase 1 (PDK1) oder die Proteinkinase B (Akt) an die Zellmembraninnenseite rekrutiert werden können. Dadurch kann Akt durch PDK1 phosphoryliert und aktiviert werden. Durch den Akt-Signalweg werden u.a. die Moleküle NF- κ B, NFAT, BCL-XL und mTOR reguliert. Die von Akt initiierten Signalwege fördern vielfältige Zellfunktionen wie Zellwachstum, Proliferation, Proteinsynthese oder Metabolismus (Chen und Flies, 2013; Rudd und Schneider, 2003). Ein für die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung wichtiges Akt Substrat ist der Transkriptionsfaktor FoxO1. Dieser steuert die Expression von Genen, welche Effektorfunktionen sowie den Ruhezustand und die Langlebigkeit von CD8⁺ T-Zellen regulieren (Rao et al., 2012). Nach PI3K- und mTOR-abhängiger Aktivierung kann Akt den Transkriptionsfaktor FoxO1 direkt phosphorylieren, wodurch dessen Wirkung durch nukleäre Exklusion aufgehoben wird (Hedrick et al., 2012).

Neben CD28 und ICOS gehören CTLA-4, PD-1 und BTLA zur selben Familie an Rezeptoren, welche durch eine extrazelluläre variable Immunglobulin-ähnliche Domäne charakterisiert sind. Die inhibitorischen Rezeptoren können über verschiedene Mechanismen die Funktion von T-Zellen regulieren. Z.B. enthält der zytoplasmatische Teil von CTLA-4 das gleiche YXXM Motiv wie CD28 und ICOS, während PD-1 Signale durch die Motive ITIM und ITSM vermitteln kann. Die Aktivierung von PD-1 führt intrazellulär zur Rekrutierung der Phosphatasen SHP-1 und SHP-2, was zur Dephosphorylierung von u.a. ZAP70, PLC γ und PKC- θ führt. Des Weiteren vermittelt PD-1 eine Inhibition des Akt-Signalwegs durch Deaktivierung von PI3K (Patsoukis et al., 2013; Schildberg et al., 2016).

Die Expression der inhibitorischen Rezeptoren ist vom jeweiligen Differenzierungsstatus der CD8⁺ T-Zellen abhängig. Während naive CD8⁺ T-Zellen BTLA und geringe Mengen an TIM-3 aufweisen, exprimieren diese nach ihrer

Aktivierung eine Vielzahl von Rezeptoren, wie z.B. CTLA-4, PD-1, TIGIT oder LAG-3. Die Expression von PD-1 und CTLA-4 erreicht ihren Höhepunkt in der CD8⁺ T-Zelleffektorphase (Fuertes Marraco et al., 2015).

1.2.4 Interaktionen zwischen kostimulatorischen und -inhibitorischen Molekülen

Zwischen kostimulatorischen und -inhibitorischen Molekülen bestehen z.T. multiple Interaktionsmöglichkeiten. Während Rezeptoren, wie CD27, 4-1BB, GITR, OX-40 oder PD-1 ihre eigenen Liganden besitzen, können an B7-1, B7-2 bzw. HVEM sowohl die kostimulatorischen Rezeptoren CD28 bzw. LIGHT als auch die inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 bzw. BTLA und CD160 binden (Abb. 3; Baumeister et al., 2016; Linsley et al., 1991; Ward-Kavanagh et al., 2016). Für humane T-Zellen wurde zudem gezeigt, dass der Ligand für ICOS (B7-H2) mit CD28 und CTLA-4 interagieren kann (Yao et al., 2011). Die unterschiedlichen Expressionsmöglichkeiten von Rezeptor-Ligand Paaren stellt eine Möglichkeit zur Regulation von kostimulatorischen und –inhibitorischen Signalen dar. Z.B. ist HVEM auch auf nichthämatopoetischen Zellen vorhanden, während die Expression von LIGHT nur auf APZ und T-Zellen beschränkt ist. Zudem sind HVEM und LIGHT gegenläufig reguliert, so dass diese nicht zugleich auf einer T-Zelle vorhanden sind. Des Weiteren kann PD-L1 sowohl auf APZ als auch auf T-Zellen exprimiert sein und nach Interaktion mit B7-1 inhibitorische Signale in T-Zellen vermitteln (Abb. 3; Chen und Flies, 2013).

Die Liganden B7-1 und B7-2 unterscheiden sich ebenfalls in ihren Expressionsprofilen, Dimerisierungseigenschaften und Affinitäten. B7-2 liegt als Monomer konstitutiv auf APZ vor und dessen Expression wird unmittelbar nach APZ-Aktivierung erhöht, während B7-1 vorwiegend als Homodimer vorkommt und zeitlich verzögert auf aktivierten APZ exprimiert wird. B7-2 bindet einerseits 13-fach schwächer an CTLA-4 als B7-1, andererseits jedoch 2- bis 3-fach effektiver an CD28. Daraus ergibt sich, dass vorwiegend B7-2:CD28 Interaktionen die T-Zellaktivierung vermitteln, während die verzögerte Expression von B7-1 präferenziell der Signalgebung von CTLA-4 dient (Collins et al., 2002). Dementsprechend ist B7-2 für die Konzentration von CD28 und B7-1 für die Lokalisation von CTLA-4 in der Synapse verantwortlich (Pentcheva-Hoang et al., 2004). Die Liganden-vermittelte

Translokation von CTLA-4 zum zentralen Bereich der immunologischen Synapse führt zur einer Änderung der Synapsenstruktur, indem CD28 aus dem zentralen Bereich verdrängt wird (Yokosuka et al., 2010).

1.2.5 Zytokinrezeptor-vermittelte Signale in CD8⁺ T-Zellen

Für eine effektive CD8⁺ T-Zellantwort sind neben TZR-Aktivierung und Kostimulation Signale notwendig, welche durch die Bindung von Zytokinen an deren jeweiligen Rezeptoren CD8⁺ T-Zellen ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang spielen Interleukin (IL) -2, IL-12 sowie Typ I und II Interferone bzw. deren Rezeptoren auf CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle. IL-2-Rezeptor vermittelte Signale optimieren die CD8⁺ T-Zellantwort in vielen Bereichen. So regulieren diese z.B. sowohl die primäre Expansion als auch die Bildung von Gedächtniszellen (Boyman und Sprent, 2012; Haring et al., 2006). IL-12 und Typ I Interferone verstärken als sogenannte Signal 3 Zytokine die Proliferation und unterstützen Ausbildung von Effektorfunktionen und Gedächtniszellen (Curtsinger und Mescher, 2010). Diese Wirkung wird vor allem durch eine verlängerte Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors vermittelt (Starbeck-Miller et al., 2014). IL-12-Rezeptor Signale führen zudem zu einer verstärkten Expression des „T-box“ Transkriptionsfaktors T-bet. Sowohl T-bet als auch der weitere „T-box“ Transkriptionsfaktor Eomes haben einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen. T-bet und Eomes kooperieren durch teilweise redundante Aktivitäten, um die Expression von IFN- γ , Granzym B und Perforinen zu induzieren (Kaech und Cui, 2012).

Das von CTL produzierte IFN- γ vermittelt seine Effekte durch den heterodimeren IFN- γ -Rezeptor. Dieser Rezeptor ist ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wodurch IFN- γ eine pleiotrope Wirkung ausüben kann. IFN- γ reguliert z.B. die Aktivität von Makrophagen, verstärkt die Antigenpräsentation, reguliert die Proliferation sowie Apoptose und spielt generell eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegen mikrobielle und virale Infektionen sowie bei der Verstärkung der Immunantwort bei Tumorerkrankungen (Ikeda et al., 2002; Schroder et al., 2004; Schüler und Blankenstein, 2003). Andererseits kann das von Lymphozyten gebildete IFN- γ in Tumorzellen zu einer Erhöhung der PD-L1 Expression führen und dadurch eine Tumorprogression bewirken (Abiko et al., 2015). Der Effekt dieses Zytokins beschränkt sich dabei nicht nur auf die Zielzellen von CTL, sondern kann sowohl

durch direkte als auch durch indirekte Mechanismen die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen selbst regulieren. IFN- γ verstärkt die primäre Expansion von CD8⁺ T-Zellen und fördert ebenfalls die Kontraktion dieser. Des Weiteren beeinflussen IFN- γ -Rezeptor-vermittelte Signale die Qualität von CD8⁺ T-Gedächtniszellen, wobei IFN- γ -Rezeptor-defiziente Gedächtniszellen in ihrer Zytokinexpression eingeschränkt sind ([Araujo-Souza et al., 2015](#); [Whitmire et al., 2007](#)).

1.2.6 Phasen der CD8⁺ T-Zellaktivierung

Der zeitliche Ablauf der primären CD8⁺ T-Zellaktivierung kann anhand der Art bzw. Dauer der Zellkontakte in unterschiedliche aufeinanderfolgende Phasen unterteilt werden ([Mempel et al., 2004](#)). Die initiale Phase ist durch kurze Kontakte zwischen APZ und schnell migrierenden CD8⁺ T-Zellen charakterisiert. Dabei werden aktivierende Signale durch Antigen-MHC-I Komplexe und B7-Liganden über den TZR bzw. den konstitutiv exprimierten co-stimulatorischen Rezeptor CD28 vermittelt. Ein besonderes Merkmal ist hierbei die zeitlich frühe Festlegung des Differenzierungsablaufs, bei welchem eine kurze Aktivierungsphase von 2 bis 24 Stunden ausreicht, um sich danach unabhängig von weiteren positiven Signalen zu teilen und zu differenzieren ([Kaech und Ahmed, 2001](#); [van Stipdonk et al., 2001](#)). Nach ausreichenden transienten Interaktionen kommt es in einer sekundären Phase zur Bildung von stabilen Zellkontakten zwischen APZ und CD8⁺ T-Zellen sowie darüber hinaus zwischen CD8⁺ T-Zellen untereinander. Letztere, homotypische T-Zell/T-Zellinteraktionen sind für die Ausbildung eines CD8⁺ T-Zellgedächtnissen notwendig und erlauben eine direkte Übertragung des Zytokins IFN- γ zwischen CD8⁺ T-Zellen. Des Weiteren ist diese Phase mit einer starken Zunahme der Oberflächenexpression des co-inhibitorischen Rezeptors CTLA-4 verbunden ([Gérard et al., 2013](#); [Hansen et al., 1980](#)).

1.3 Die Rolle von CTLA-4 im Immunsystem

CTLA-4 wurde durch eine Analyse von murinen CTL-cDNA Bibliotheken entdeckt, während CD28 mit Hilfe von Antikörper auf humanen T-Zellen identifiziert wurde ([Brunet et al., 1987](#); [Hansen et al., 1980](#)). Beide Rezeptoren weisen homologe Strukturen besonders in der Ligandenbindungsregion sowie im zytoplasmatischen Teil auf ([Harper et al., 1991](#)). Mit der Entwicklung von Antikörper gegen CTLA-4

konnten funktionelle Analysen durchgeführt werden, welche einen vorwiegend inhibitorischen Effekt auf T-Zellfunktionen aufzeigten (Kearney et al., 1995; Krummel und Allison, 1995; Linsley et al., 1992; Walunas et al., 1994). Eine definitive Rolle von CTLA-4 als essentieller Inhibitor von T-Zellantworten wurde vor allem durch den Phänotyp von CTLA-4 k.o. Mäusen geprägt, welche im Alter von 3 bis 4 Wochen an einer lymphoproliferativen Erkrankung mit massiver Organinfiltration durch aktivierte Lymphozyten sterben (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). Die dabei auftretende T-Zell-vermittelte, fatale Multiorgan-Inflammation ähnelt einer systemischen Autoimmunität, bei der Apoptose-resistente CD4⁺ T-Zellen mit einem vorwiegendem Th2 Differenzierungsstatus auftreten. Der Phänotyp der CTLA-4 k.o. Mäuse ist dabei abhängig vom CD28 PYAP Motiv und verweist auf eine wichtige Funktion von CTLA-4 für die Aufrechterhaltung der T-Zellhomeostase (Khattri et al., 1999; Tai et al., 2007). Erfolgt eine Deletion von CTLA-4 erst in adulten Mäusen resultiert dies ebenfalls in einer starken Lymphoproliferation, welche jedoch lethal verläuft (Klocke et al., 2016; Paterson et al., 2015). Beim Menschen verursacht eine CTLA-4-Haploinsuffizienz ebenfalls eine Lymphoproliferation und bestimmte CTLA-4-Polymorphismen sind mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Systemischer Lupus Erythematoses, Rheumatoide Arthritis oder Typ I Diabetis, assoziiert (Kuehn et al., 2014; Romo-Tena et al., 2013).

1.3.1 Die Regulation der CTLA-4 Expression

Im Gegensatz zu CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen, bei denen CTLA-4 konstitutiv auf der Zelloberfläche vorhanden ist, wird der inhibitorische Rezeptor auf FoxP3⁻ (konventionellen) T-Zellen aktivierungsabhängig und mit zeitlicher Verzögerung exprimiert. Dabei ist eine Erhöhung CTLA-4 mRNA bereits ab 4 - 6 h nach Aktivierung und eine Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche ab 24 - 48 h nach Aktivierung nachweisbar. (Lindsten et al., 1993; Linsley et al., 1992; Pandiyan et al., 2007; Takahashi et al., 2000). Die Expression von CTLA-4 wird einerseits durch Gentranskription u.a. über NFAT and FoxP3 und andererseits durch post-transkriptionale Mechanismen, wie z.B. die Erhöhung der CTLA-4 mRNA-Stabilität, kontrolliert (Finn et al., 1997; Gibson et al., 2007; Zheng et al., 2007).

Des Weiteren wird CTLA-4 durch die Begrenzung der Rezeptorverfügbarkeit auf der Zelloberfläche reguliert. Dies erfolgt durch kontinuierliche, Ligand-unabhängige

endosomale Internalisierung von CTLA-4-Oberflächenmolekülen mit anschließender teilweiser Degradation bzw. Re-Expression auf der Zellmembran (Qureshi et al., 2012). Die Lokalisation des CTLA-4-Proteins ist dabei abhängig von dessen Tyrosinphosphorylierung im zytoplasmatischen Teil, wobei unphosphoryliertes CTLA-4 über AP-2 Clathrin-vermittelt internalisiert wird (Shiratori et al., 1997). Im Gegensatz dazu bewirkt eine T-Zellaktivierung, dass CTLA-4 gezielt an der Stelle der TZR-Aktivierung auf der Zelloberfläche freigesetzt wird, wodurch bereits geringe Mengen an CTLA-4 ihre Wirksamkeit entfalten können (Iida et al., 2000; Linsley et al., 1996).

1.3.2 Die Funktionsweisen von CTLA-4 und dessen Blockade bei der Tumortherapie

Trotz der Bedeutung von CTLA-4 als starker Inhibitor von T-Zellantworten sind die Mechanismen, mit denen CTLA-4 die adaptive Immunantwort reguliert noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch die Bindung der gleichen Liganden wie CD28 ergibt sich eine vielschichtige Funktionsweise des Rezeptors, bei der Zell-intrinsische und -extrinsische Effekte auftreten können. Durch eine Zell-intrinsische Wirkung kann CTLA-4 die Zelle regulieren, auf der es exprimiert wird, während Zell-extrinsische Mechanismen die CTLA-4-vermittelte Regulation einer Zelle durch eine andere beinhalten (Abb. 4). CTLA-4 kann seine Funktionen einerseits über seinen intrazellulären Teil durch Signaltransduktion oder andererseits über seine extrazelluläre Domäne z.B. durch Konkurrenz um Liganden oder durch Änderung der Synapsenstruktur vermitteln (Bachmann et al., 1999; Masteller et al., 2000; Yokosuka et al., 2010).

Zell-intrinsische und -extrinsische Mechanismen können miteinander verbunden sein, wenn z.B. im Prozess der Transendozytose durch die Internalisierung von CTLA-4 und dessen gebundenen Liganden die Verfügbarkeit von kostimulatorischen B7-Molekülen auf der Zelloberfläche von APC verringert wird (Qureshi et al., 2011). Eine selektive CTLA-4-Defizienz in regulatorischen (FoxP3⁺) T-Zellen führt zu ebenfalls zu einer systemischen Lymphoproliferation mit fataler T-Zell-vermittelter Autoimmunität, was eine wichtige Zell-extrinsische Funktion von CTLA-4 darstellt (Wing et al., 2008). Des Weiteren kann durch die Bindung von CTLA-4 an B7-1 und B7-2 die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase in Dendritischen Zellen induziert werden,

wodurch es zu einer Regulation von T-Zellen aufgrund der Verringerung der extrazellulären Tryptophanmenge kommen kann (Grohmann et al., 2002).

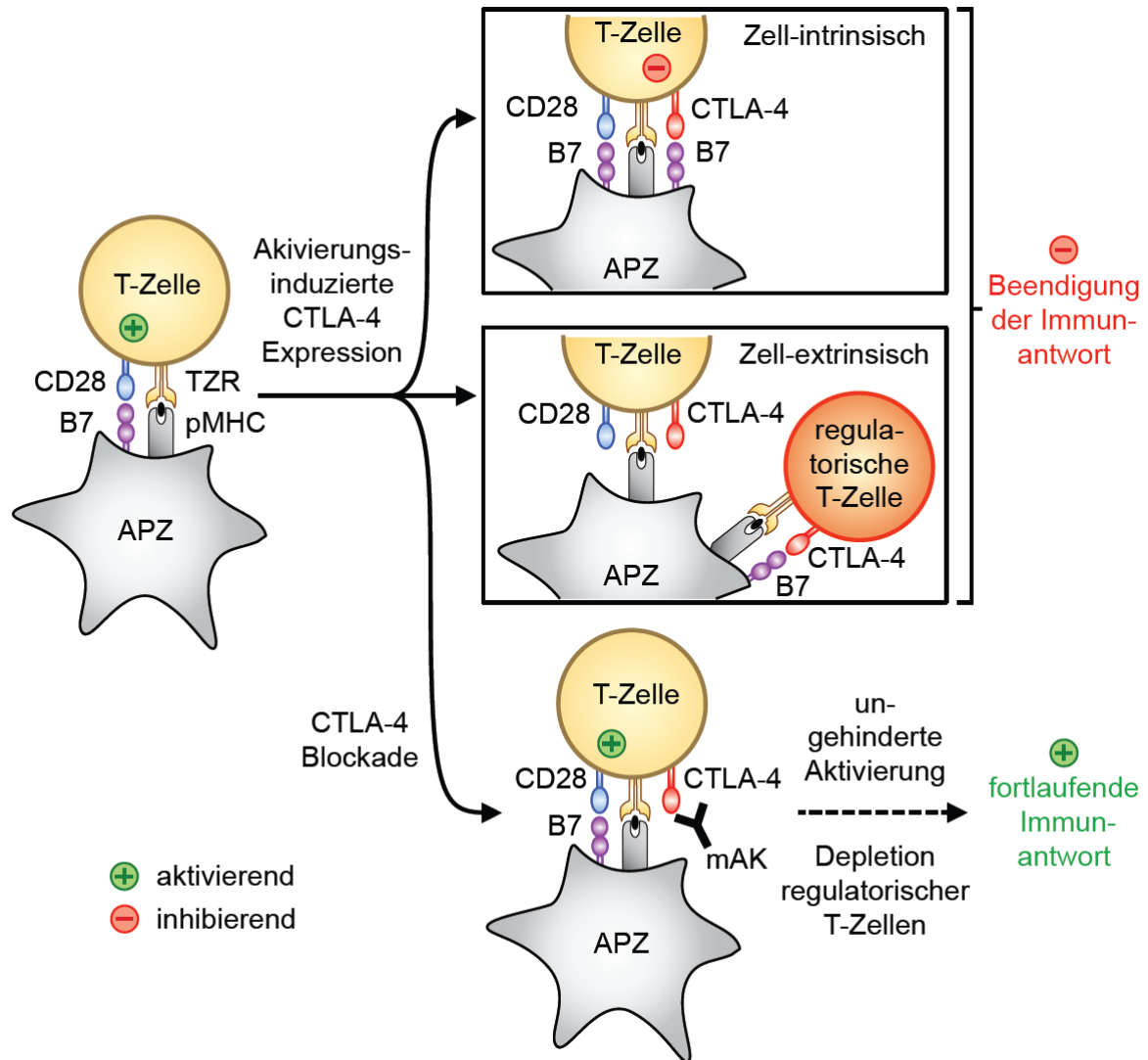


Abb. 4: CTLA-4-abhängige Mechanismen und der Effekt einer CTLA-4 Blockade.

CTLA-4 wird durch T-Zellaktivierung induziert und kann über Zell-intrinsische Mechanismen, wie z.B. durch intrazelluläre Signaltransduktion, die Immunantwort inhibieren. Des Weiteren kann CTLA-4 über extrinsische Mechanismen, wie z.B. die Reduktion von B7 auf APZ durch regulatorische T-Zellen, die T-Zellaktivierung hemmen. Ein monoklonaler Antikörper (mAK) gegen CTLA-4 verhindert die CTLA-4-B7 Interaktion und führt zur Depletion von regulatorischen T-Zellen, wodurch eine ungehinderte Aktivierung und damit eine fortlaufende Immunantwort erzeugt wird (abgeänderte Abbildung nach Baumeister et al., 2016).

Zudem existieren multiple Spleißvarianten von CTLA-4, welche u.a. ein CTLA-4-Protein ohne B7-Ligandenbindungsdomäne Form codieren. Diese CTLA-4 Variante

kann zell-intrinsisch eine Dephosphorylierung der ζ -Ketten im TZR-Komplex vermitteln (Vijaykrishnan et al., 2004). Des Weiteren kann CTLA-4 die Kontaktzeit und -fläche zu APZ verringern und dadurch die Bildung von ZAP-70-enhaltenden Signalkomplexen inhibieren (Schneider et al., 2008a). Zell-intrinsische Signale können durch Anlagerung von Adapter- bzw. Signalmoleküle im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors bewirkt werden. Für CTLA-4 wurde gezeigt, dass neben PI3K auch die Phosphatasen SHP-2 und PP2A sowie die Kinase PKC η gebunden werden können, wodurch sowohl positive als auch negative Signale vermittelt werden können (Kong et al., 2014; Rudd et al., 2009). In CD4⁺ T-Zellen resultiert dementsprechend eine Aktivierung von CTLA-4 z.B. in Überlebenssignalen für anergische Zellen, einer differentiellen Regulation von MAPK oder in einer Verringerung der IL-2 Expression (Brunner et al., 1999; Carreno et al., 2000; Schneider et al., 2002; Schneider et al., 2008b). Als weiterer Mechanismus wurde in CD4⁺ T-Zellen die CTLA-4-vermittelte Aktivierung der Ubiquitinligase Itch beschrieben, was eine Inhibition von T-Zellfunktionen durch Ubiquitinierung des Itch Zielproteins JunB ermöglicht (Hoff et al., 2010).

Der lymphoproliferative Phänotyp der CTLA-4 k.o. Mäuse wird allein durch CD4⁺ T-Zellen vermittelt, was auf eine unterschiedliche Rolle von CTLA-4 in CD8⁺ T-Zellen hinweist (Chambers et al., 1997). Die proliferative Antwort von CTLA-4-defizienten oder -blockierten CD8⁺ T-Zellen ist nach primärer Aktivierung vergleichbar zu Kontrollzellen (Chambers et al., 1998; Chan et al., 2014; Pandiyan et al., 2007). In CD8⁺ T-Zellen reguliert CTLA-4 vorrangig deren Effektorfunktionen und Zytotoxizität u.a. durch eine erhöhte Granzym B-Expression oder IFN- γ -Produktion. Des Weiteren zeigen sich starke CTLA-4-vermittelte Effekte vor allem in sekundären CTL-Antworten bzw. nach Reaktivierung von CD8⁺ T-Zellen, was u.a. durch eine CTLA-4-anhängige Verringerung des Transkriptionsfaktors Eomes bewirkt wird (Chambers et al., 1998; Hegel et al., 2009; Pandiyan et al., 2007).

CTLA-4 hat neben PD-1 ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen während chronischer Virus- oder Krebserkrankungen. Aufgrund des anhaltenden Krankheitsverlaufs gehen CTL in einen Zustand der zellulären Dysfunktion („Exhaustion“) über, in welchem diese u.a. eine verringerte Reaktivität aufweisen. Dieser adaptive Differenzierungsstatus verhindert, dass die permanente

Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zu einer Schädigung des Gewebes führt ([Schietinger und Greenberg, 2014](#)). Die Expression von CTLA-4 und PD-1 führt zur Aufrechterhaltung dieses Zustands und durch eine Antikörper-vermittelte Blockade der inhibitorischen Rezeptoren können die betroffenen CTL ihre Funktionalität wiedererlangen ([Nakamoto et al., 2009](#); [Zarour, 2016](#)).

Aufgrund seiner bedeutenden Rolle in der Regulation von adaptiven Immunantworten, wurden im Rahmen einer sogenannten Immun-Checkpoint-Krebstherapie blockierende Antikörper erstmals gegen CTLA-4 eingesetzt. Neben präklinischen Versuchsmodellen zeigten ebenso klinische Erhebungen eine signifikante Erhöhung der anti-tumoralen Immunität, die z.B. bei einer Phase III Studie in einer 1,6-fachen Erhöhung der Überlebensrate bei Krebspatienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom resultierte ([Hodi et al., 2010](#); [Kwon et al., 1997](#); [Leach et al., 1996](#)). Eine CTLA-4 Blockade kann dabei die Immunantwort verstärken, indem sowohl die Zell-intrinsische Regulation von Effektor-T-Zellen als auch Zell-extrinsische Mechanismen, z.B. durch die Depletion von regulatorischen T-Zellen, aufgehoben werden ([Abb. 4](#)). Der therapeutischen Effekt von anti-CTLA-4 Antikörpern ist u.a. abhängig von der Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen ([Baumeister et al., 2016](#); [Peggs et al., 2009](#); [Selby et al., 2013](#); [van Elsas et al., 1999](#)). Die Blockade von CTLA-4 kann zur Verstärkung des PD-1/PD-L1 Signalwegs führen, wodurch eine Kombination von CTLA-4- und PD-1-blockierenden Antikörpern stärkere anti-tumorale Effekte erzielen kann. Die Wirkung ist dabei von IFN- γ -Signalen in Tumorspezifischen Lymphozyten abhängig ([Shi et al., 2016](#)). Durch eine Immun-Checkpoint Therapie mit anti-PD-1 Antikörpern kommt es zur Expansion von Tumorerkrankung infiltrierenden CD8⁺ T-Zellsubpopulationen, während anti-CTLA-4 Antikörper zusätzlich zu einer Erhöhung von ICOS⁺ Th1-ähnlichen Effektorzellen führen. Daher kann eine CTLA-4 Blockade die anti-tumorale Immunantwort durch verschiedene Mechanismen regulieren ([Wei et al., 2017](#)).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Mechanismen, mit denen CTLA-4 die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen reguliert und den funktionell eingeschränkten Zustand von CTL in Tumorerkrankung aufrecht erhält, sind noch weitgehend unbekannt. Die bisherigen Untersuchungen über

CTLA-4-vermittelte Signale wurden vorwiegend an CD4⁺ T-Zellen durchgeführt. Aufgrund der verschiedenen Wirkung von CTLA-4 auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, wie z.B. die Regulation von sekundären anstatt primären T-Zellantworten, können jedoch die bereits über CTLA-4 erlangten Kenntnisse nicht uneingeschränkt von CD4⁺ auf CD8⁺ T-Zellen übertragen werden.

Die Funktionsweise von CTLA-4 ist in CD8⁺ T-Zellen durch deren spezifische Aktivierungsweise geprägt. Charakteristisch für CD8⁺ T-Zellen ist eine frühzeitige Festlegung des Differenzierungsablaufs, nach deren weiterführende positive Signale nicht mehr erforderlich sind. Aufgrund der zeitlich verzögerten Expression, wirkt CTLA-4 auf Zellen mit hoher transkriptionaler Aktivität und bereits etablierten Genexpressionsprofilen. Die Arbeitshypothese basiert daher auf der Annahme, dass in CD8⁺ T-Zellen eine bloße Unterbindung von positiven Signalen durch CTLA-4 nicht ausreicht, um die Aktivität und Differenzierung von CTL nachhaltig zu kontrollieren. Diesbezüglich kann eine CTLA-4-vermittelte Regulation von Differenzierungsprogrammen vor allem durch post-transkriptionale Mechanismen erfolgen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von CTLA-4-induzierten Mechanismen, welche in CD8⁺ T-Zellen eine Änderung der Expression auf post-transkriptionaler bzw. -translationaler Stufe hervorrufen. Die Identifikation von CTLA-4 Zielproteinen sollte durch eine Analyse des Phosphoproteoms von CTLA-4-aktivierten CTL erfolgen. Hierfür musste ein Kultivierungssystem für CD8⁺ T-Zellen etabliert werden, welches zielgenaue Signale für CTLA-4 mittels agonistischer Antikörper erzeugen kann. Unter den identifizierten Molekülen sollten insbesondere diejenigen weiter untersucht werden, welche die Reaktivität gegenüber Tumorzellen beeinträchtigen könnten. Die CTLA-4-modulierten Signatransduktionswege sollten darüber hinaus identifiziert und hinsichtlich ihrer Relevanz für anti-tumorale Immunantworten überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Mauslinien

Für die Experimente wurden Mäuse mit dem C57BL/6 Hintergrund eingesetzt, zum Einen als WT oder mit PDCD4 Defizienz (PDCD4^{-/-}) und zum Anderen mit transgenen TZR spezifisch für das Ovalbuminpeptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ / SIINFEKL (OT-I Mäuse, C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb), entweder mit zusätzlichen CTLA-4 oder PDCD4 Gendefekt. PDCD4^{-/-} Mäuse (B6.129S6-Pdcd4^{tm1Yhcn}/J) wurden von der Firma The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen und wie alle anderen Mauslinien unter pathogenfreien Bedingungen im zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät Magdeburg gehalten bzw. gezüchtet. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit PDCD4^{-/-} Mäuse mit OT-I Tieren gekreuzt. Für die Experimente wurden Mäuse mit einem Alter von 6-12 Wochen aus eigener Zucht verwendet. Die Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit staatlichen und institutionellen Richtlinien.

2.1.2 Zellen und Zelllinien

Für einige Experimente wurden CD8⁺ T-Zellen aus Milzen von Mäusen mit loxP-flankiertem *Foxo1* Gen (Foxo1^{fl/fl}) verwendet. Die Milzzellen wurden von Prof. Klaus Rajewsky (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) zur Verfügung gestellt. Für *in vivo* Tumorexperimente wurden Ovalbumin-exprimierende Melanomzellen (B16-OVA), zur Verfügung gestellt von Prof. Jochen Hühn (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) oder Luciferase-exprimierende Prostatakarzinomzellen (TRAMP-C1 Luc), bezogen von der Firma Applied Biological Materials (Richmond, Kanada), eingesetzt.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies / Isotyp	Quelle
αAkt (pan)	C67E7	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
αAldolase A	D73H4	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

α CD3	145-2C11	Hamster IgG ₁ , κ	BioLegend, San Diego, USA
α CD8a	53-6.7	Ratte IgG _{2a} , κ	BioLegend, San Diego, USA
α CD28	37.51	Hamster IgG ₂ , λ	BioLegend, San Diego, USA
α CD44	IM7	Ratte IgG _{2b} , κ	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α CD45.2	104	Maus IgG _{2a} , κ	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α CD62L	MEL-14	Ratte IgG _{2a} , κ	BioLegend, San Diego, USA
α CD90.2 (Thy-1.2)	53-2.1	Ratte IgG _{2a} , κ	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
α CTLA-4 (α CD152)	UC10-4F10	Hamster IgG ₁ , κ	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α eIF4A	polyklonal	Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology, Danvers, USA
α eIF4A	C32B4	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α eIF4G	C45A4	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α Eomes	Dan11mag	Ratte IgG _{2a} , κ	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
α FoxO1	C29H4	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α Fra-2	polyklonal	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
α GAPDH	A3	Maus IgG ₁ , κ	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
α Glutaminase	EP7212	Kaninchen IgG	Abcam, Cambridge, UK
α Hamster IgG	polyklonal	Ziege IgG	BioLegend, San Diego, USA
α IFN- γ	XMG1.2	Ratte IgG ₁ , κ	BioLegend, San Diego, USA
α Lamin B1	polyklonal	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α p-AKT ^{S473}	polyklonal	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α p-AKT ^{T308}	polyklonal	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α PDCD4	D29C6	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α p-FoxO1 ^{S253}	polyklonal	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

α p-PDCD4 ^{S457}	9G6	Maus IgG ₁	Rockland Immunochemicals, Limerick, USA
α p-PKC-theta ^{T538}	polyklonal	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α T-bet	O4-46	Maus IgG ₁ , κ	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α Ubiquitin	P4D1	Maus IgG ₁	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
α V α 2-TCR	B20.1	Ratte IgG _{2a} , λ	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
anti-Mouse IgG IRDye [®] 800CW	polyklonal	Ziege IgG	LI-COR, Lincoln, USA
anti-Rabbit IgG IRDye [®] 680RD	polyklonal	Ziege IgG	LI-COR, Lincoln, USA
Isotypkontrolle (α TNP)	A19-3	Hamster IgG ₁ , κ	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

2.1.4 Chemikalien und Kits

Chemikalien

14-22 Amid PKA-Inhibitor	Merck Millipore, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
AS1842856	Merck Millipore, Darmstadt
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Brefeldin A	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
BSA (Bovines Serumalbumin), Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
CFSE (Carboxyfluorescein-succinimidyl Ester)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Cycloheximid	AppliChem, Darmstadt
D-Luciferin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DTT (Dithiothreitol)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA (Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
FCS (Fötale Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Forskolin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

G418 (Geneticindisulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin, 5000 U/ml	Biochrom, Berlin
HEPES (4-(2-Hydroxymethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
IGEPAL [®] CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ionomycin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MG132 Proteasomeninhibitor	Merck Millipore, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumpyruvat	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, 4% in DPBS	Morphisto, Frankfurt a.M.
Penicillin/Streptomycin	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Phosphataseinhibitor PhosSTOP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor cOmplete	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Puromycin	Carl Roth, Karlsruhe
Rnase Inhibitor, rekombinant, 40 U/μl	Takara Bio, Kusatsu, Japan
Rottlerin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe

Kits

eBioscience™ FoxP3 Färbepuffer Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
MiSeq® Reagent Kit v3 (150 cycle)	Illumina, San Diego, USA
NucleoSpin RNA®	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin miRNA®	Machery-Nagel, Düren
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RNA Analysis Screen Tape Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit	Epicentre, Madison, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Feinchemikalien und Oligonukleotide

Anti-FITC-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
αDEC-OVA	selbst hergestellt
B7.1 (CD80)-Fc, Fusionsprotein	Biolegend, San Diego, USA
CD90.1 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DimerX I, H2-K[b]:Ig Fusionsprotein	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Interleukin-12 (IL-12), p70	Biolegend, San Diego, USA
Interleukin-2 (IL-2)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
micro-RNA Sonden TaqMan® MicroRNA Assays	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid (SIINFEKL)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein-G-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Scriptseq™ Index PCR Primer	Epicentre, Madison, USA
Sulfate Latex Beads (Mikrosphären), 5 µm	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SYBR® Green qPCR Master Mix	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TAT-Cre Rekombinase	Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin
Trypsin	Merck Millipore, Darmstadt

Primer für quantitative PCR (Quelle: TIB MOLBIOL, Berlin)

Primer	Forward	Reverse
<i>Fosl2</i>	5'-CAGCAGAAGTTCCGGGTAG-3'	5'-TCCTCCTCAGGAGACAGC-3'
<i>Gapdh</i>	5'-GTCCCGTAGACAAAATGGTG-3'	5'-CAAGCTTCCCATTCTCGG-3'
<i>Gls</i>	5'-GCAGCGGGATTATGACTCC-3'	5'-GAGGTGTGTACTGAACTTGG-3'
<i>Ifngr1</i>	5'-TGTTACCTAAGTCCTTGCTC-3'	5'-TCTTCCTGTTCTGCTGCTTC-3'
<i>Ifngr2</i>	5'-GTTCTCAAATACCAAAGCC-3'	5'-ATAATTGACACGGAGTCCCA-3'
<i>Il12rb1</i>	5'-GGTGCCTGGAGTCATC-3'	5'-CCAATGTATCCGAGACTGC-3'
<i>Il12rb2</i>	5'-CCACCAGTCCCAGTATG-3'	5'-TCCTTCCTGGACACATGA-3'
<i>Pdcd4</i>	5'-ATGGATATAGAAAATGAGCAGAC-3'	5'-CTGGACCGCCTATCTAGC-3'
<i>Tcf7</i>	5'-GACATCAGCCAGAAGCAAG-3'	5'-GTGCTGTCTATATCCGCAG-3'

2.1.6 Medien, Lösungen und PufferKommerziell erworbene Medien, Lösungen und Puffer

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Medium Prigrow III	Applied Biological Materials, Richmond, Kanada
Medium RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbach
Medium HyClone ADCF-Mab Medium	GE Healthcare, Marlborough, USA
Protein-Gelladepuffer Roti®-Load	Carl Roth, Karlsruhe
Western Blot Blocking Buffer Odyssey®	LI-COR, Lincoln, USA
Western Blot Stripping Buffer Restore™	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Selbst hergestellte Medien, Lösungen und Puffer

Blotting-Puffer für Western Blot	25 mM TRIS + 192 mM Glycin + 20% Methanol in dH ₂ O
DPBSA-Lösung	DPBS + 0,5 % BSA
DPBST-Lösung	DPBS + 0,1 % Tween® 20
Elektrophoresepuffer	25 mM TRIS + 192 mM Glycin + 0,1 % SDS in dH ₂ O

Erythrozytenlysepuffer	10 mM KHCO ₃ + 155 mM NH ₄ Cl + 0,1 mM EDTA Dinatriumsalz Dihydrat in dH ₂ O, pH 7,5
Permeabilisierungspuffer	0,5 % Saponin in DPBSA-Lösung
Puffer für Gesamtzell-extrakte	1 % IGEPAL [®] CA-630 + 50 mM TRIS (pH 7,8) + 10 mM NaCl + 1 mM Natriumorthovanadat + 1x Proteaseinhibitor + 1x Phosphataseinhibitor in dH ₂ O
Puffer für zytoplasmatische Extrakte	10 mM KCl + 10 mM HEPES + 0,1 mM EGTA + 0,1 mM EDTA Dinatriumsalz Dihydrat + 1 mM DTT + 1 mM Natriumorthovanadat + 1x Proteaseinhibitor + 1x Phosphataseinhibitor in dH ₂ O
Puffer für nukleäre Extrakte	420 mM KCl + 20 mM HEPES + 1 mM EGTA + 1 mM EDTA Dinatriumsalz Dihydrat + 1 mM DTT + 1 mM Natriumorthovanadat + 1x Proteaseinhibitor + 1x Phosphataseinhibitor in dH ₂ O
Puffer für RNA-Koimmunpräzipitation	1% IGEPAL [®] CA-630 + 50 mM TRIS (pH 7,8) + 100 mM NaCl + 1 mM Natriumorthovanadat + 1x Proteaseinhibitor + 1x Phosphataseinhibitor + 1,6 U/µl Rnase Inhibitor in dH ₂ O
Sammelgellösung, für Proteingele	16,3 % Rotiphorese [®] Gel 30 + 12,7 % 1,5M TRIS (pH 6,8) + 0,1 % SDS + 0,1 % APS + 0,1 % TEMED in dH ₂ O
Trenngellösung für Proteingele	33,3 % Rotiphorese [®] Gel 30 + 25 % 1,5M TRIS (pH 8,8) + 0,1 % SDS + 0,1 % APS + 0,04 % TEMED in dH ₂ O
Zellfixierlösung	DPBS + 2 % Paraformaldehyd
Zellkulturmedium für CD8 ⁺ T-Zellen	RPMI 1640 Medium +10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium für B16-OVA Zellen	RPMI 1640 Medium +10 % FCS + 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin + 1 mM Natriumpyruvat + 50 µM Beta-Mercaptoethanol + 25 mM HEPES + 1 mg/ml G418
Zellkulturmedium für TRAMP-C1 Luc Zellen	Prigrow III Medium +10 % FCS + 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin
Zellsortierungspuffer	DPBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA Dinatriumsalz Dihydrat

2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Blockthermostat BT200	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Brutschrank / CO ₂ Inkubator CB210	Binder, Tuttlingen
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA

DNA-Enginge Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN Tetra Handcast / Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Flüssigstickstofflagerbehälter Locator 6 Plus	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierbehälter Mr. Frosty™	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Inversmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
IVIS 200 <i>in vivo</i> Imaging System	PerkinElmer, Waltham, USA
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Messschieber	Mitutoyo, Neuss
µMACS Seperator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MiSeq Desktop Sequencer	Illumina, San Diego, USA
NanoPhotometer Classic	Implen, München
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
OctoMACS Seperator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Odyssey Imaging System	LI-COR, Lincoln, USA
Orbitalschüttler CM9	Sarstedt, Nümbrecht
Orbitalschüttler DOS-20L	LTF Labortechnik, Wasserburg
pH-Messgerät WTW pH330i	Xylem, Weilheim
Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Akku-betrieben	Hirschmann, Eberstadt
Plattformschüttler, wippend Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage BP 110 S	Sartorius, Göttingen
QuadroMACS Seperator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
TapeStation Analyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Sterilwerkbank HERAsafe KS 18	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Stromversorgungsgerät PowerPac 1000	Bio-Rad, Hercules, USA
Vortex Schüttler VF2	IKA, Staufen
Western Blot System Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Zentrifuge Heraeus Biofuge fresco	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Verbrauchsmaterialien

Einfriergefäß neoScrew 2 ml	neoLab, Heidelberg
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Feindosierungsspritzen Omnifix®-F 1ml	Braun, Melsungen
Kanülen Microlance™ 3 27G	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Nitrocellulose Membran Protran BA 85	GE Healthcare, Solingen
PCR Platte 96 Well farblos	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Standard	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter Biosphere®	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Platten Seal Film	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reagiergefäße SafeSeal 200 µl; 500 µl; 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
RNA ScreenTape	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Separationssäulen µ Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Serologische Pipetten 10 ml; 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritzen 2 ml Discardit™	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Spritzenfilter Rotilabo® 0,2 µm Celluloseacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte Costar® 96 Well Flat Bottom	Corning, Corning, USA
Zellseparationssäulen LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zellseparationssäulen MS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zellsieb Cell Strainer, 70 µm Nylon	Corning, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR® 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.2 Methoden**2.2.1 Mausgenotypisierung**

Die Typisierung des CTLA-4 sowie des PDCD4 Genotyps von OT-I CTLA-4^{-/-} bzw. PDCD4^{-/-} Mäusen erfolgte wie bereits beschrieben (Hegel et al., 2009; Hilliard et al., 2006). Zur Bestimmung der TZR-Transgenität wurden Blutproben in Heparin-haltigem (200 U/ml) RPMI Medium gewonnen und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.2.8).

2.2.2 Gewinnung von CD8⁺ T-Zellen und APZ aus Milz und Lymphknoten

Zur Gewinnung von CD8⁺ T-Zellen und APZ wurden die entsprechenden Mäuse durch zervikale Dislokation geopfert und nach deren sofortigen Tod die Milz und inguinalen, axillaren, brachialen und mesenterialen Lymphknoten entnommen. Die Aufarbeitung der Milzen und Lymphknoten erfolgte durch Vereinzelung der Zellen mittels Spritzenstempel (2 ml Spritze) durch ein Zellsieb. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Erythrozytenlysepuffer pro Maus resuspendiert und für 4 min bei 4 °C inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von DPBSA-Lösung gestoppt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet mit DPBSA-Lösung gewaschen.

Zur Isolation von APZ wurden 5×10^6 Zellen in 90 µl DPBSA-Lösung mit 10 µl CD90.1 MicroBeads versetzt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und in Zellsortierungspuffer aufgenommen und auf eine Zellseparationssäule (MS Column) in einem Magnetseparator gegeben. Die Zellen im Durchfluss wurden als T-Zell-depletierte APZ verwendet. Zur Gewinnung von CD8⁺ T-Zellen wurden 10^7 Zellen von Milz-/Lymphknotenzellsuspensionen in DPBSA-Lösung aufgenommen und mit 2,5 µg/ml FITC-konjugierten α CD8a Antikörper für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen in DPBSA-Lösung mit 10% Anti-FITC MicroBeads versetzt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und in Zellsortierungspuffer auf eine Zellseparationssäule (MS Column) in einem Magnetseparator gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit Zellsortierungspuffer wurden diese aus dem Magnetseparator genommen und die gebundenen Zellen mit Zellsortierungspuffer eluiert. Der Sortierungsvorgang über die Zellseparationssäule wurde anschließend wiederholt. Bei einem Ansatz mit mehr als 10^7 Milz-/Lymphknotenzellen wurden LS Column Zellseparationssäulen verwendet. Die Anzahl der isolierten lebenden APZ und CD8⁺ T-Zellen wurde mit Hilfe einer 1:10 Trypanblaulösung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die isolierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie überprüft (siehe 2.2.8).

2.2.3 CFSE Markierung von CD8⁺ T-Zellen zur Bestimmung der Proliferation

In einigen Experimenten wurden CD8⁺ T-Zellen nach deren Isolation mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE beladen, indem diese für 4 min bei 4 °C mit 2,5 µM CFSE in DPBSA-Lösung inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe Zellkulturmedium für CD8⁺ T-Zellen gestoppt und anschließend wurden die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen. Durch die nach der T-Zellaktivierung auftretende Zellteilung kommt es zu einer Verdünnung des fluoreszierenden Farbstoffs, welche im Durchflusszytometer gemessen wurde (siehe 2.2.9).

2.2.4 TAT-Cre Transduktion von CD8⁺ T-Zellen

Die aus Milzen von Foxo1^{fl/fl} Mäusen isolierten Foxo1^{fl/fl} CD8⁺ T-Zellen wurden in einer Dichte von 5 x 10⁶ Zellen/ml in HyClone ADCF-Mab Medium aufgenommen und auf 37 °C vorgewärmt und mit 50 µg/ml sterilfiltrierter TAT-Cre Lösung für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 2 mal mit Zellkulturmedium gewaschen. Als Kontrolle wurden Foxo1^{fl/fl} CD8⁺ T-Zellen ohne TAT-Cre Zugabe identisch behandelt (Otipoby et al., 2015; Peitz et al., 2002). Die Behandlung der Foxo1^{fl/fl} CD8⁺ T-Zellen mit TAT-Cre Rekombinase dient der Deletion des *Foxo1* Gens.

2.2.5 Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen *in vitro*

Die isolierten CD8⁺ T-Zellen von C57BL/6 (WT) Mäusen wurden durch an Mikrosphären (Beads) gekoppelte Antikörper aktiviert (Abb. 5A). Dazu wurden Sulfate Latex Beads mit einem Durchmesser von 5 µm in einer Dichte von 1x10⁷ Mikrosphären pro ml in DPBS resuspendiert und mit 0.75 µg/ml αCD3, 2 µg/ml αCD28 und 7 µg/ml αCTLA-4 oder Isotypkontrollantikörper für 45 min bei Raumtemperatur und 150 rpm inkubiert. Danach wurden die Mikrosphären gewaschen und in Zellkulturmedium für CD8⁺ T-Zellen für weitere 45 min bei Raumtemperatur und 150 rpm inkubiert (Krummel und Allison, 1995). Jeweils 2x10⁵ CD8⁺ T-Zellen wurden mit 2x10⁵ Mikrosphären in 120 µl Zellkulturmedium mit 10 ng/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-12 pro Well in einer Zellkulturplatte 96 Well Flat Bottom bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. CD8⁺ T-Zellen von TZR-transgenen OT-I Mäusen wurden zum Einen durch isolierte APZ aktiviert (Abb. 5B). Jeweils 2x10⁵ CD8⁺ T-Zellen wurden mit 0,5x10⁵ APZ in 120 µl Zellkulturmedium mit

100 µg/ml OVA und 0.2 µg/ml α DEC-OVA sowie 1 ng/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-12 pro Well in einer Zellkulturplatte 96 Well Flat Bottom bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. α DEC-OVA Konjugate wurden wie bereits zuvor beschrieben hergestellt (Hegel et al., 2009).

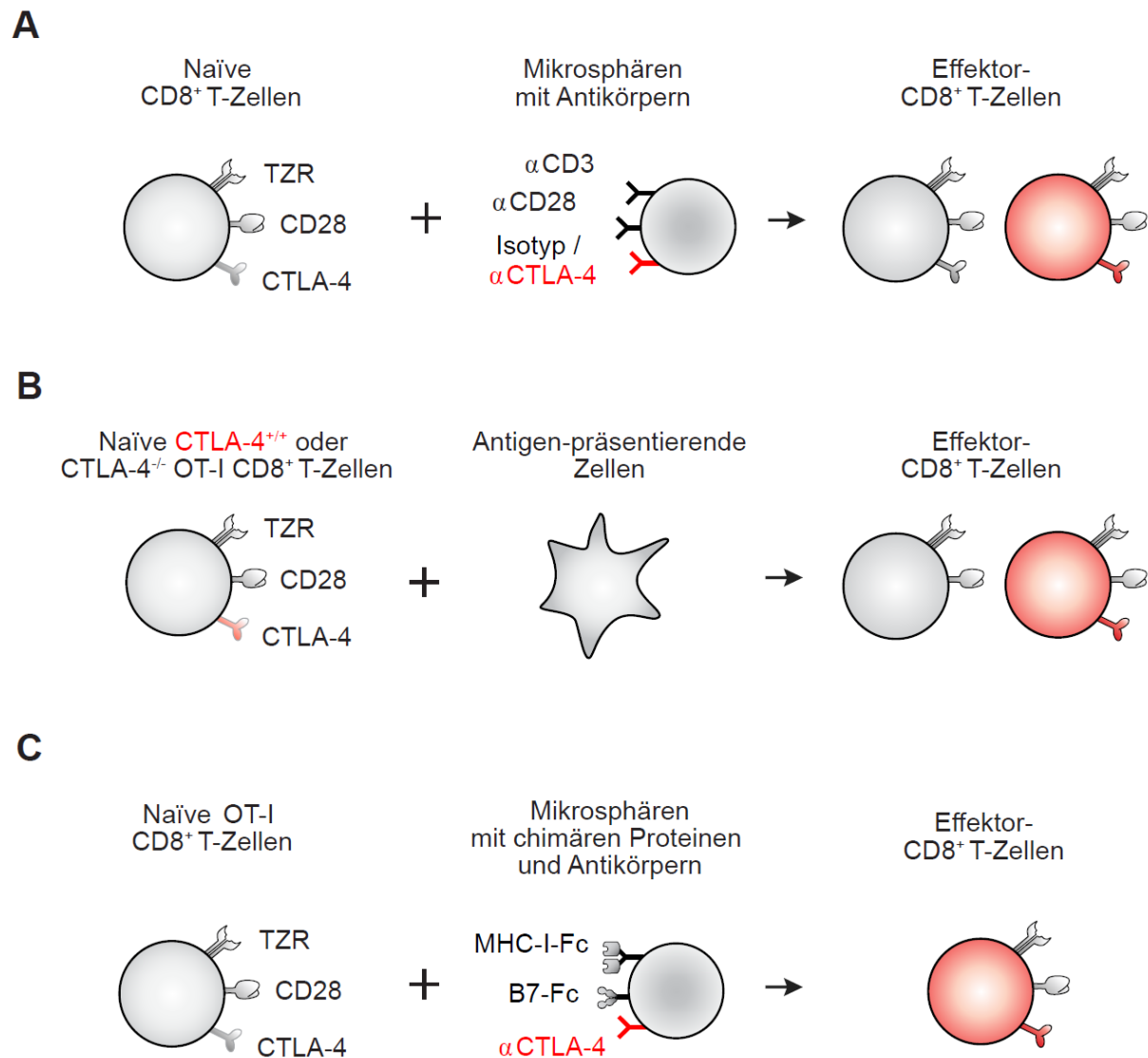


Abb. 5: Übersicht über die angewandten Differenzierungssysteme für CD8⁺ T-Zellen.

(A) Naïve CD8⁺ T-Zellen mit unspezifischen TZR wurden durch agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert.

(B) Naïve CD8⁺ T-Zellen mit transgenem TZR (OT-I) wurden durch Ovalbumin-beladene Antigen-präsentierende Zellen aktiviert.

(C) Naïve CD8⁺ T-Zellen mit transgenem TZR (OT-I) wurden durch OVA-I-Peptid (SIINFEKL) beladene Mikrosphären mit gebundenen chimären MHC-I- und B7-Proteine sowie agonistischen Antikörpern gegen CTLA-4 aktiviert.

CD8⁺ T-Zellen, die während der Differenzierung ein CTLA-4 Signal erhalten haben, sind in rot dargestellt.

Zum Anderen wurden in einigen Experimenten CD8⁺ T-Zellen von TZR-transgenen OT-I Mäusen durch an Mikrosphären gekoppelte Fusionsproteine und Antikörper aktiviert (Abb. 5C). Die Mikrosphären wurden wie oben beschrieben mit 1 µg/ml DimerXI Fusionsprotein, 5 µg/ml B7.1-Fc Fusionsprotein und 8 µg/ml αCTLA-4 Antikörper beladen. Danach wurden die Mikrosphären für 2 h mit 0,1 µM OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid (SIINFEKL) bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Zellkulturmedium gewaschen. Jeweils 2x10⁵ CD8⁺ T-Zellen wurden mit 2x10⁵ Mikrosphären in 120 µl Zellkulturmedium für CD8⁺ T-Zellen mit 10 ng/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-12 pro Well in einer Zellkulturplatte 96 Well Flat Bottom bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Einige Ansätze wurden 60 h vor der Analyse mit 4 mM L-Glutaminsäure versetzt.

2.2.6 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von Tumorzelllinien

Ovalbumin exprimierende Melanomzellen (B16-OVA; Klages et al., 2010) und TRAMP-C1 Luc Prostatakarzinomzellen wurden in Zellkulturflächen mit dem entsprechenden Medium bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Tumorzellen wurden während einer logarithmischen Wachstumsphase geteilt bzw. eingefroren oder für Experimente verwendet. Dazu wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 0,25 % Trypsin in DPBS für 3 min bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend mit Zellkulturmedium gewaschen. Das Einfrieren erfolgte in einer Dichte von 3 x 10⁶ Zellen pro ml im Zellkulturmedium unter Zugabe von 10 % DMSO bei -80 °C für 24 h im Gefrierbehälter. Die Zellen wurden in der Gasphase des Flüssigstickstofflagerbehälters aufbewahrt. Das Auftauen der Tumorzellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in 37 °C warmes Zellkulturmedium überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellen in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.7 Experimentelle Tumormodelle

Vor der Verwendung für experimentellen Tumormodelle wurden die jeweiligen Tumorzellen für mindestens 48 h kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden zunächst

von der Zellkulturflasche abgelöst (siehe 2.2.6) und zur weiteren Verwendung in DBPS aufgenommen. Die Ly5.1 Empfängermäuse wurden subkutan mit 2×10^5 B16-OVA Tumorzellen inokkuliert. Den Empfängermäusen wurden 5 Tage später 3.3×10^6 naive CD8⁺ OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{+/+} oder OT-I CTLA-4^{-/-} PDCD4^{+/+} oder OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{-/-} T-Zellen intravenös injiziert. Die Tumorabmessungen wurden mit einer Schieblehre in drei Dimensionen bestimmt, wodurch die Tumorgöße als hemi-elliptisches Volumen berechnet werden konnte. 6 Tage nach dem adoptiven T-Zelltransfer wurden Blutproben in Heparin-haltigem (200 U/ml) RPMI Medium gewonnen und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.2.9).

Im experimentellen Tumormodell mit Prostatakarzinomzellen (Kwon et al., 1997) wurden PDCD4 WT oder k.o. Mäuse mit 2×10^6 Luciferase-exprimierenden TRAMP-C1 Luc Zellen subkutan inokkuliert. Ein Teil der WT Mäuse erhielt zusätzlich am Tag 6, 10 und 13 intraperitoneale Injektionen von jeweils 100 µg αCTLA-4 Antikörper. Dieser Antikörper wurde aus Hybridomzellüberstand gewonnen (Hegel et al., 2009). Das Vorhandensein bzw. die vollständige Beseitigung von TRAMP-C1 Luc Tumorzellen wurde durch *in vivo* Lumineszenz Messungen kontrolliert. Dazu wurden Mäuse 150 mg/kg D-Luciferin intravenös injiziert und anschließend mit Isofluran anästhesiert. Die Analyse der Mäuse erfolgte mittels eines IVIS 200 *in vivo* Imaging Systems.

2.2.8 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen

Zur Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden diese durch Fluoreszenz-konjugierte Antikörper gegen spezifische T-Zellstrukturen gefärbt oder durch das fluoreszierende Molekül CFSE beladen (siehe 2.2.3). Die markierten Zellen passieren anschließend im Durchflusszytometer einzeln Laserstrahlen, wobei das emittierte und gestreute Licht detektiert wird. Die Messungen wurden an einem FACS-Canto II durchgeführt und mittels FlowJo Software (Version 10, Tree Star, Ashland, USA) ausgewertet und dargestellt.

Zur Bestimmung von CD8⁺ T-Zellen in Blutproben wurden die Ansätze für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und das Pellet in Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 4 min bei 4 °C inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von DPBSA-Lösung gestoppt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und mit DPBSA-Lösung

gewaschen. Zur Überprüfung der Expression des OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid-spezifischen, transgenen T-Zellrezeptors wurden die Zellen in DPBSA-Lösung mit α CD8a und α V α 2-TCR Antikörper (jeweils 1 μ g/ml) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit DPBSA-Lösung gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Überprüfung des Reinheitsgrades von isolierten Zellen wurden eine Probe der jeweiligen Fraktion in DPBSA-Lösung entnommen. Die Probe der APZ wurde mit 1 μ g/ml fluoreszierenden α CD90.2 Antikörper für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit DPBSA-Lösung gewaschen und deren Fluoreszenz am Durchflusszytometer gemessen. Es wurden APZ mit weniger als 1 % CD90.2⁺ Zellen verwendet und der Anteil der isolierten CD8⁺ T-Zellen betrug mehr als 99 %.

Für die Messung der Oberflächenantigene von kultivierten CD8⁺ T-Zellen wurden diese mit DPBSA-Lösung gewaschen und mit fluoreszierenden α CD8a, α CD44 und α CD62L Antikörpern (jeweils 1 μ g/ml) in DPBSA-Lösung für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit DPBSA-Lösung gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Bestimmung der Internalisierung von CTLA-4 Oberflächenmolekülen wurde in den Überstand von kultivierten CD8⁺ T-Zellen 5 μ g/ml ungekoppelter α CTLA-4 oder Isotypkontrollantikörper gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Ansätze für 30 min bei 37 °C im Brutschrank. Die internalisierten Antikörper wurden durch durchflusszytometrische Analyse von intrazellulären Antigenen bestimmt (siehe 2.2.9).

2.2.9 Durchflusszytometrische Analyse von intrazellulären Molekülen

Vor der Bestimmung der intrazellulären IFN- γ Konzentration von polyklonal oder APZ-aktivierten CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5A und B) wurde diese mit 5 μ g/ml Brefeldin A für 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. DimerX I / B7.1-Fc / α CTLA-4 aktivierte OT-I CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5C) wurden vor der Analyse mit 10 μ g/ml PMA, 1 μ g/ml Ionomycin und 5 μ g/ml Brefeldin A für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ebenso wie die Ansätze zur Analyse internalisierten Antikörpern (siehe 2.2.8) in DPBS-Lösung gewaschen und in Zellfixierungslösung für 15 min bei 4°C inkubiert. Darauffolgend wurden die Ansätze zuerst mit DPBS-Lösung und danach mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, um die Zellen in Permeabilisierungspuffer mit fluoreszierenden α CD8a (1 μ g/ml), α CTLA-4

(0,5 µg/ml) und α IFN- γ (0,25 µg/ml) Antikörpern oder zur Analyse von internalisierten Antikörpern mit fluoreszierenden α Hamster (0,5 µg/ml) Antikörpern für 15 min bei 4 °C zu inkubieren. Anschließend wurden die Ansätze mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und in DPBSA-Lösung mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Analyse von CFSE-beladenen CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte entweder zusammen mit anderen intrazellulären Molekülen oder separat nach der Färbung von CD8 auf der Zelloberfläche (siehe 2.2.8). Zur Bestimmung der Expression von Transkriptionsfaktoren wurde der eBioscience™ FoxP3 Färbepuffer Kit in Verbindung mit α T-bet und α Eomes Antikörpern (jeweils 1 µg/ml) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Bei den in experimentellen Tumormodellen gewonnenen Blutproben wurden die Erythrozyten wie zuvor beschrieben lysiert (siehe 2.2.8). Danach wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und mit 10 µg/ml PMA, 1 µg/ml Ionomycin und 5 µg/ml Brefeldin A für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Oberflächenmarkierung mit fluoreszierenden α CD8a und α CD45.2 Antikörpern (jeweils 1 µg/ml) sowie eine darauffolgende intrazelluläre Färbung mit α IFN- γ (0,25 µg/ml) Antikörpern. Die Ansätze wurden mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und in DPBSA-Lösung mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.10 iTRAQ Massenspektrometrie

Die phosphorylierten Proteine in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen und in Kontrollzellen wurden durch vergleichende iTRAQ Massenspektrometrie untersucht. Die Analyse erfolgte in 2 unabhängigen Experimenten. Am Tag 2 wurden die Zellen in der Zellkulturplatte resuspendiert, anschließend für 30 Sekunden bei 400 x g zentrifugiert und für 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um aktive Zellkontakte zu gewährleisten. Danach wurden die phosphorylierten Proteine isoliert, verdaut und am Massenspektrometer gemessen, was in Kooperation mit der Zellulären Proteomforschung am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig erfolgte ([van Ham et al., 2017](#)).

Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden mittels Mascot Server (Version 2.8, Matrix Science, Boston, USA) prozessiert und mit der UniProtKB/Swiss-Prot Proteindatenbank (Release 2012_08) abgeglichen. Es wurden die folgenden

Suchparameter verwendet: enzyme, trypsin; maximum missed cleavages, 1; fixed modifications, iTRAQ 4-plex (K), iTRAQ (N terminus), Methylthio (C); variable modifications, oxidation (M), phosphorylation of S, T and Y; peptide tolerance, 2 ppm; MS/MS tolerance, 20 ppm. Um die Phosphopeptide zu quantifizieren wurde die Software Scaffold (Version 4.0.5, Proteome Software, Portland, USA) verwendet. Es wurden nur Peptide in Betracht gezogen, die in beiden unabhängigen Experimenten mindestens 2 mal und mit einer Wahrscheinlichkeit mit mehr als 90 % identifiziert wurden. Die quantitativen Informationen der iTRAQ Kanäle wurden durch die Matrix [0.00150,0.00950,0.910,0.0769,0.00250]; [0.00130,0.0159,0.864,0.116,0.00300]; [0.00330,0.0238,0.904,0.0650,0.00340]; [0.00200,0.0313,0.913,0.0526,0.00130] entsprechend dem i-Tracker Algorithmus korrigiert ([Shadforth et al., 2005](#)). Die Normalisierung der Intensitäten erfolgte anhand des jeweiligen globalen Datensatzes. Es wurden nur Phosphopeptide berücksichtigt, die eine relative Intensität von mindestens 50.000 aufwiesen. Falls dieselbe Phosphorylierungsstelle in verschiedenen Peptiden enthalten war, wurde der Mittelwert für deren Regulation gebildet.

2.2.11 Immunpräzipitation von Proteinen

Die Immunpräzipitation erfolgte an Tag 2 unter Verwendung von Protein-G-MicroBeads durch magnetische Separation mit μ Column Separationssäulen entsprechend den Herstellerangaben. Zur Gewinnung von Zelllysaten wurden 8×10^6 CD8⁺ T-Zellen für 5 min bei 400 x g bei 4 °C zentrifugiert und mit DBPS gewaschen. Die Präzipitation von eIF4A erfolgte unter Verwendung des Puffers für Gesamtzellextrakte und des α eIF4A Klon C32B4 Antikörpers ([Kroczynska et al., 2012](#)). Für die Präzipitation von PDCD4 und Aldolase A wurden durch an Mikrosphären gekoppelte α CD3, α CD28 und α CTLA-4 Antikörper aktivierte CD8⁺ T-Zellen und der Puffer für RNA-Koimmunopräzipitation entsprechend verwendet. Die Zellen wurden vor ihrer Lyse mit 100 μ g/ml Cycloheximid für 60 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.12 Gewinnung von CD8⁺ T-Zelllysaten für Western Blot

Vor der Extraktion von Zelllysaten aus Kokulturen mit APZ ([Abb. 5B](#)) wurden die CD8⁺ T-Zellen durch FITC-konjugierten α CD8a Antikörper und Anti-FITC

MicroBeads isoliert (siehe 2.2.2). Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden 2×10^6 CD8⁺ T-Zellen für 5 min bei 400 x g bei 4 °C zentrifugiert und mit DBPS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Puffer für Gesamtzellextrakte für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 17000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Western Blot analysiert. In einigen Experimenten wurde die Zellen vor ihrer Lyse mit 5 µM MG132 für 2 h oder 0.5 µM AS1842856 für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Zur subzellulären Fraktionierung wurden entsprechend 5×10^6 CD8⁺ T-Zellen eingesetzt und gewaschen. Die Zellen wurden in Puffer für zytoplasmatische Extrakte für 2 min und anschließend unter Zugabe eines gleichen Teils von 1 %iger IGEPAL CA-630 (NP-40) in dH₂O Lösung für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 15 min bei 16000 x g bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände für die Analyse von zytoplasmatischen Proteinen abgenommen. Nach dem Waschen der Pellets wurden diese in Puffer für nukleäre Extrakte für 15 h bei 1400 rpm im Orbitalschüttler bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 15 min bei 16000 x g bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände für die Analyse von nukleären Proteinen abgenommen. In einigen Experimenten wurde die Zellen vor ihrer Lyse mit 40 µM Forskolin oder 10 µM 14-22 Amid für 60 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.13 Detektion von Proteinen mittels Western Blot

Zur Analyse von Proteinen mittels Western Blot wurden die zellulären Extrakte oder Immunpräzipitate zunächst mit Protein-Gelladepuffer für 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend in einem 10 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese erfolgte ein Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran mit 1x Odyssey Blocking Buffer in DBPS für 60 min. Danach wurde die Membran über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper in 1x Blocking Buffer in DPBST-Lösung bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit DPBST-Lösung wurde die Membran mit sekundären IRDye[®] Antikörpern (1:20.000) in 1x Odyssey Blocking Buffer in DPBST-Lösung für 40 min inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Die Visualisierung und Analyse der Membran-gebundenen Proteine erfolgte mittels Odyssey Imaging System. Falls erforderlich, wurde die Membran mit Stripping Buffer Restore[™] für 15 min inkubiert, anschließend mit DPBST-Lösung gewaschen und erneut mit 1x

Western Blot Blocking Buffer Odyssey in DBPS für 60 min inkubiert, um danach Proteine erneut mit Primär- und Sekundärantikörpern entsprechend zu detektieren.

2.2.14 Gewinnung von RNA und cDNA

Zur Extraktion der kleinen RNA (micro-RNA) und mRNA-Fraktionen aus CD8⁺ T-Zellen oder Immunpräzipitaten (siehe 2.2.12) wurde der NucleoSpin[®] miRNA Kit bzw. der NucleoSpin[®] RNA Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Erstellung von cDNA erfolgte durch reverse Transkription der kleinen RNA- und mRNA-Fraktionen aus CD8⁺ T-Zellen mittels TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit bzw. RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.15 Quantitative PCR-Analyse

Die Bestimmung der Konzentration der mRNA-Fraktionen erfolgte unter Verwendung des Maxima[™] SYBR Green qPCR Master Mix. Die Menge an kleinen RNAs wurde durch TaqMan micro-RNA Sonden bestimmt. Die Analyse der RNAs erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mittels C1000 Thermal Cycler und CFX Manager Software (Version 1.5, Bio-Rad, Hercules, USA). Die mRNA-Fraktionen wurden anhand des Anteils an *Gapdh* mRNA normalisiert, während die Normalisierung der Menge an *miR-21* unter Berücksichtigung der *sno202* RNA Konzentrationen erfolgte.

2.2.16 Next Generation Sequencing

Eine ausreichende Integrität der RNA von PDCD4- or Aldolase A-Immunpräzipitaten wurde mittels TapeStation Analyse ermittelt. Die Erstellung der RNA-Bibliothek erfolgte durch Einsatz von je 20 ng RNA aus der Koimmunoprecipitation (siehe 2.2.14 / 2.2.12) unter Verwendung des ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit und der ScriptSeq Index PCR Primer entsprechend der Herstellerangaben. Die Sequenzierung wurde an einem MiSeq Desktop Sequencer mit einem MiSeq Reagent Kit v3-150 durchgeführt. Die Sequenzierdaten wurden mit der RNA Express Software (Illumina, San Diego, USA) durch STAR Aligner Kartierung ([Dobin et al., 2013](#)) mit Abgleich zum Mausgenoms *Mus musculus* UCSC mm10 und unter Verwendung der

DESeq2 Methode ([Anders und Huber, 2010](#)) zur Analyse von differentiellen mRNA Mengen ausgewertet.

2.2.17 Statistische Analyse der Daten

P Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurden die *P* Werte mit einem zweiseitigem Mann-Whitney Ranksummen Test berechnet. Bei mehr als 2 Gruppen wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn Korrektur verwendet. Alle berechneten Signifikanzen bestanden auch bei der Verwendung des äquivalenten parametrischen Tests. Die Signifikanz für den Vergleich von TRAMP-C1 Luc Tumor-tragenden Mäusen wurde durch einen Log-Rank (Mantel-Cox) Test berechnet. Die Bestimmung der signifikant unterschiedlich phosphorylierten Peptide erfolgte durch die Unterscheidung von regulierten und zufällig fluktuierenden Werten in einer hohen Anzahl von kleinen Proben ([Klawonn, 2012](#)). Die statistischen Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: ns – nicht signifikant, **P*<0,05, ****P*<0,001.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von CTLA-4-vermittelten Signalen auf CD8⁺ T-Zellen

3.1.1 Agonistische CTLA-4 Signale bewirken eine spezifische Reduktion der IFN- γ -Produktion

Die Auswirkung von CTLA-4 auf CD8⁺ T-Zellen wurden bisher nur mit Hilfe von blockierenden Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten oder mittels CTLA-4-defizienter Mäuse bzw. Zellen untersucht (Chambers et al., 1998; Hegel et al., 2009; Pandiyan et al., 2007). Für die massenspektrometrische Analyse von CTLA-4-vermittelten Proteinphosphorylierungen war es notwendig, ein *in vitro* Aktivierungssystem zu etablieren, welches Wechselwirkungen mit CD28 durch kompetitive Ligandenbindung ausschließt. Um dies zu gewährleisten, wurden naive CD8⁺ T-Zellen durch agonistische Antikörper, gebunden an Mikrosphären, gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert (Abb. 5A; Krummel und Allison, 1995). Zudem entfällt bei diesem System die nachträgliche Aufreinigung der CD8⁺ T-Zellen, was eine verzögerungsfreie Extraktion der phosphorylierten Proteine ermöglicht. Da CTLA-4 aktivierungsabhängig und mit zeitlicher Verzögerung exprimiert wird, erfolgte zunächst eine Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der CTLA-4 Expression auf polyklonal aktivierten CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Menge an CTLA-4 auf der Zelloberfläche wurde anhand dessen Internalisierung bestimmt (Shiratori et al., 1997). Diese trat in verstärktem Ausmaß an den Tagen 2 und 3 auf, konnte aber an Tag 1 nicht verzeichnet werden (Abb. 6).

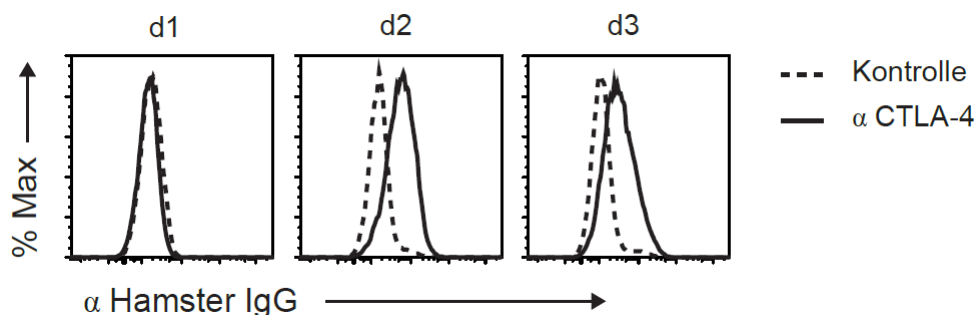


Abb. 6: Die Expression von CTLA-4 auf polyklonal aktivierten CD8⁺ T-Zellen.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3 und CD28 aktiviert. An den Tagen 1, 2 und 3 wurden die Zellen jeweils mit anti-CTLA-4- oder Kontrollantikörpern inkubiert und danach deren Internalisierung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Um die Zellaktivierung und das Ausmaß eines CTLA-4 Effekts zu überprüfen, wurden die Proliferation, die Expression von aktivierungsabhängigen Oberflächenmolekülen sowie die IFN- γ Produktion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die mit und ohne zusätzlichem CTLA-4 Signal aktivierten CD8⁺ T-Zellen wiesen eine vergleichbare Zellteilung auf, gemessen an der daraus resultierenden Verdünnung des zuvor beladenen CFSE (Abb. 7).

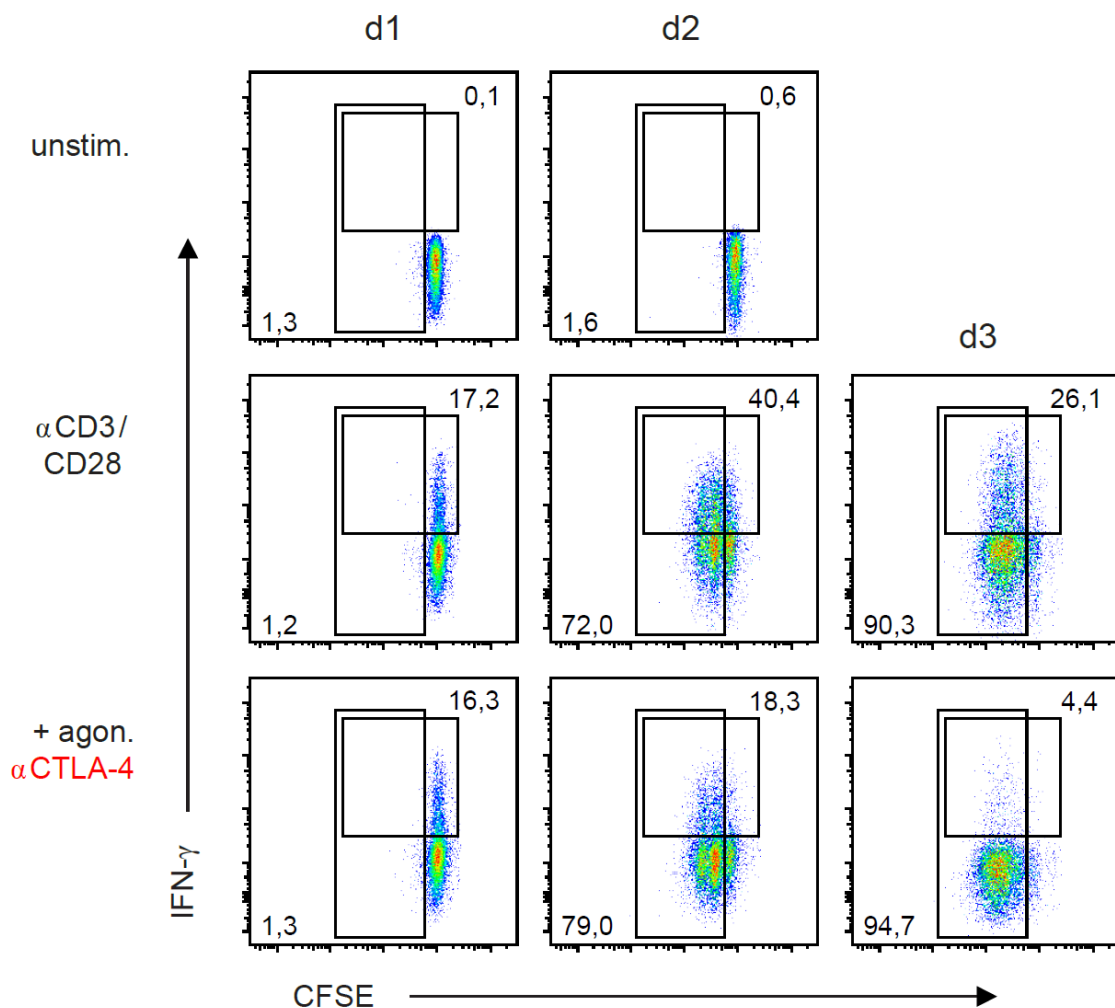


Abb. 7: CTLA-4-vermittelte Signale bewirken eine spezifische Reduktion der IFN- γ -Produktion in differenzierenden CD8⁺ T-Zellen.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden mit CFSE beladen und durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. An den Tagen 1, 2 und 3 wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie bezüglich der angegebenen intrazellulären Parameter analysiert. Zahlen geben die prozentualen Anteile der IFN- γ ⁺ oder der geteilten Zellen an. Die Daten sind repräsentativ für n=5 unabhängige Experimente.

Des Weiteren konnte eine gleichmäßige Verstärkung der CD44 Expression bzw. Verringerung von CD62L detektiert werden (Abb. 8). Es wurden ebenso einheitliche Anteile an IFN- γ positiven Zellen am Tag 1 ermittelt (Abb. 7). Hierdurch war gewährleistet, dass am Tag 1, bevor CTLA-4 exprimiert wird (Abb. 6), alle Zellen gleichermaßen aktiviert wurden. An den Tagen 2 und 3 zeigten jedoch CTLA-4-aktivierte CD8⁺ T-Zellen eine mehr als 50 % verringerte IFN- γ -Produktion (Abb. 7). Des Weiteren kam es in diesen Zellen zu einer erhöhten Expression von CD62L an Tag 2 (Abb. 8). Die verzeichneten IFN- γ und CD62L Effekte trat somit zeitgleich zur CTLA-4 Oberflächenexpression auf (Abb. 6-8). Diese Messwerte belegen, dass das angewandte Kultivierungssystem eine adäquate Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen mit starken, exklusiv durch CTLA-4-vermittelten Effekten ermöglicht.

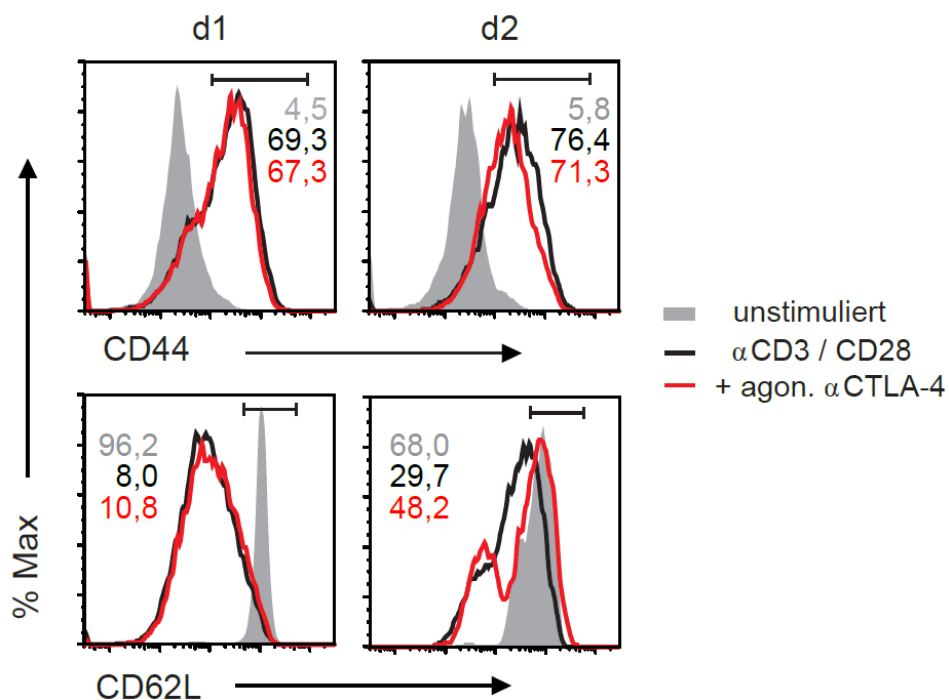


Abb. 8: CTLA-4-induzierte Mechanismen führen auf aktivierten CD44⁺ CD8⁺ T-Zellen zu einer erhöhten Re-Expression von CD62L.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. An den Tagen 1 und 2 wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie bezüglich der angegebenen Oberflächenantigene analysiert. Zahlen geben die jeweiligen prozentualen Anteile der CD44⁺ und CD62L^{hi} Zellen an. Die Daten sind repräsentativ für n=3 unabhängige Experimente.

Die IFN- γ Expression wird in CD8⁺ T-Zellen durch das Zusammenspiel der beiden Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomes reguliert (Kaech und Cui, 2012). Um die CTLA-4-vermittelten Effekte auf die IFN- γ -Produktion in CD8⁺ T-Zellen näher zu charakterisieren, wurde die Menge von T-bet und Eomes in CTLA-4-aktivierten Zellen sowie in Kontrollzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Aktivierung von CTLA-4 zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Expression dieser Transkriptionsfaktoren (Abb. 9).

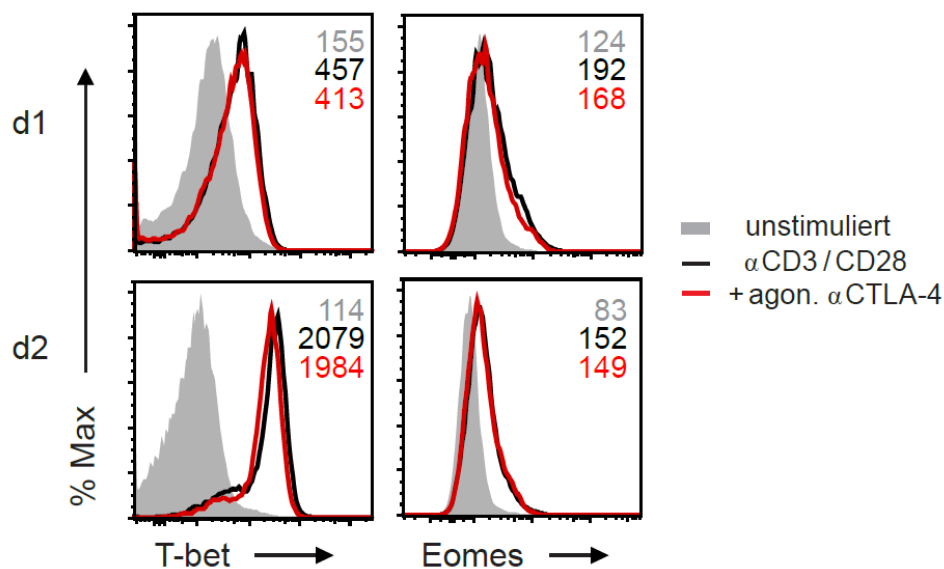


Abb. 9: CTLA-4 vermittelt keinen Einfluss auf die Expression von T-bet und Eomes während der primären Aktivierung.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. An den Tagen 1 und 2 wurden die mittels Durchflusszytometrie bezüglich der Expression der angegebenen Transkriptionsfaktoren analysiert. Zahlen geben die geometrischen Mittelwerte der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Um zu bestimmen, ob CTLA-4 Signale auf IFN- γ durch Effekte auf die übergeordneten IL-12 und IFN- γ Zytokinrezeptoren wirken, wurde deren Expression mittels quantitativer PCR analysiert. Die mit und ohne zusätzlichem CTLA-4 Signal aktivierten CD8⁺ T-Zellen wiesen keine Unterschiede in der IL-12 Rezeptor Expression auf (Abb. 10A). Bei der Expression des IFN- γ Rezeptors konnte am Tag 3 eine signifikant erhöhter mRNA Menge in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden (Abb. 10B). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das angewandte Aktivierungssystem eindeutig CTLA-4-vermittelte Effekte auf differenzierende CD8⁺ T-

Zellen ermöglicht und somit die Voraussetzung für die massenspektrometrische Analyse erfüllt.

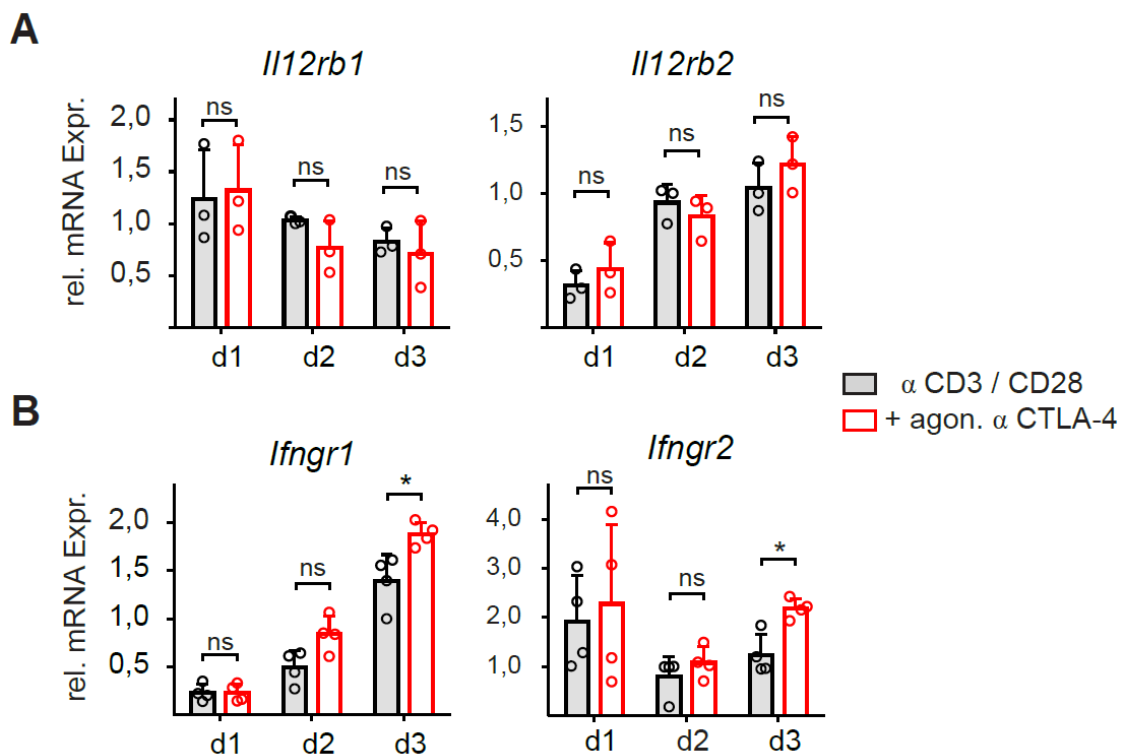


Abb. 10: Der Einfluss von CTLA-4 auf die IL-12- und IFN- γ -Rezeptor Expression.

(A und B) Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. An den Tagen 1, 2 und 3 wurde die mRNA isoliert und mittels quantitativer PCR bezüglich *Il12rb1* und *Il12rb2* (A) oder *Ifngr1* und *Ifngr2* (B) Transkripte analysiert. Datenpunkte repräsentieren n=3 (A) oder n=4 (B) biologische Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; *p<0,05; nach Berechnung durch Mann-Whitney Test.

3.1.2 Die Aktivierung von CTLA-4 löst definierte Änderungen innerhalb des Phosphoproteoms von CD8⁺ T-Zellen aus

Um bisher noch unbekannte Ziele von CTLA-4 zu identifizieren, wurden von CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen sowie von Kontrollzellen am Tag 2 die phosphorylierten Proteine extrahiert und mittels „iTRAQ“ Massenspektrometrie miteinander verglichen. Die zusammenfassende Analyse von zwei biologischen Replikaten ergab eine signifikante CTLA-4-abhängige Änderung in 89 Phosphopeptiden, welche 74 Proteinen zugeordnet werden konnten. Davon waren durch CTLA-4-vermittelte Signale 63 Phosphorylierungsprofile stärker und 26 schwächer ausgeprägt (Abb. 11; Anlage 1).

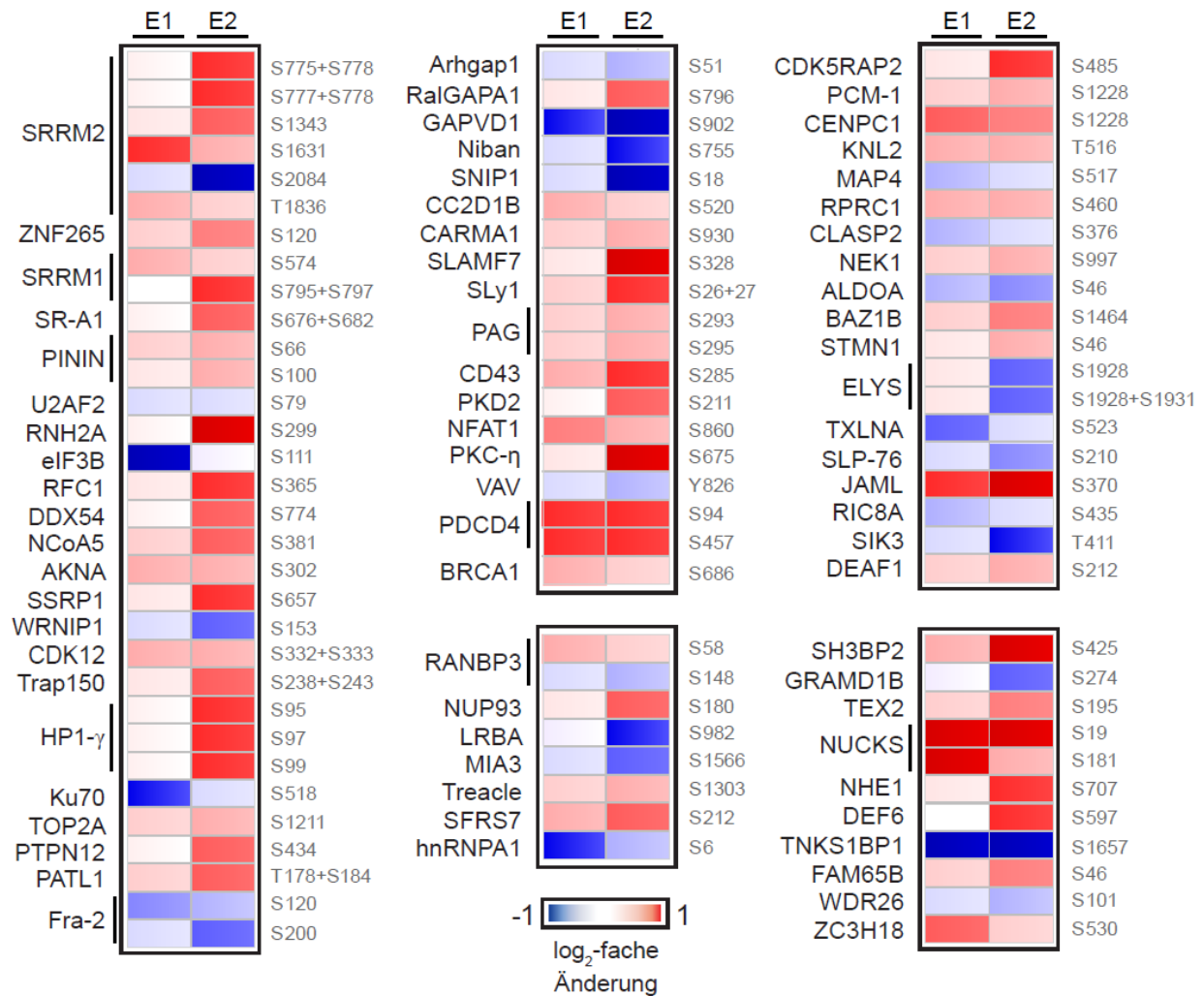


Abb. 11: CTLA-4-induzierte Änderungen im Phosphoproteom von CD8⁺ T-Zellen.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Am Tag 2 wurden die phosphorylierten Proteine isoliert und mittels vergleichender massenspektrometrischer Analyse (iTRAQ) quantifiziert. Dargestellt sind die Änderungen in der Häufigkeit der Phosphorylierungsstellen (log₂-fache Werte), die in CTLA-4-aktivierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen in zwei unabhängigen Experimenten (E1, E2) auftraten (blau – schwächere Änderung; rot – stärkere Änderung). Die Proteine wurden anhand ihres GO:BP semantischen Verwandtschaftsgrades angeordnet (Mazandu und Mulder, 2013).

Für die Ermittlung der von CTLA-4 Signalen betroffenen zellbiologischen Prozesse wurden die signifikant regulierten Proteine mittels „BABELOMICS“ Software (Al-Shahrour et al., 2005) annotiert und bezüglich der Kategorie „Biologischer Prozess“ der Ontologie „Gene Ontology“ (GO:BP) analysiert. Es konnte eine funktionelle Anreicherung in den folgenden Hauptkategorien festgestellt werden: Zytokinproduktion, T-Zellaktivierung, RNA Prozessierung, DNA Replikation und Regulation von Mikrotubuli-basierten Prozesse (Abb. 12; Anlage 2). Um die

Interaktionsmöglichkeiten der von CTLA-4 Signalen betroffenen Proteine festzustellen, wurde der Datensatz mit Hilfe der „NetworkAnalyst“ Software (Xia et al., 2014) untersucht. Diese Ermittlung basiert auf experimentell validierten Daten verwendet und berechnet zusätzliche Interaktionsmöglichkeiten. Letztere wurden nur berücksichtigt, falls diese eine Verbindung zwischen massenspektrometrisch ermittelten Proteinen herstellen. Die Analyse ergab ein Netzwerk von 67 Proteinen mit 81 Interaktionen (Abb. 12).

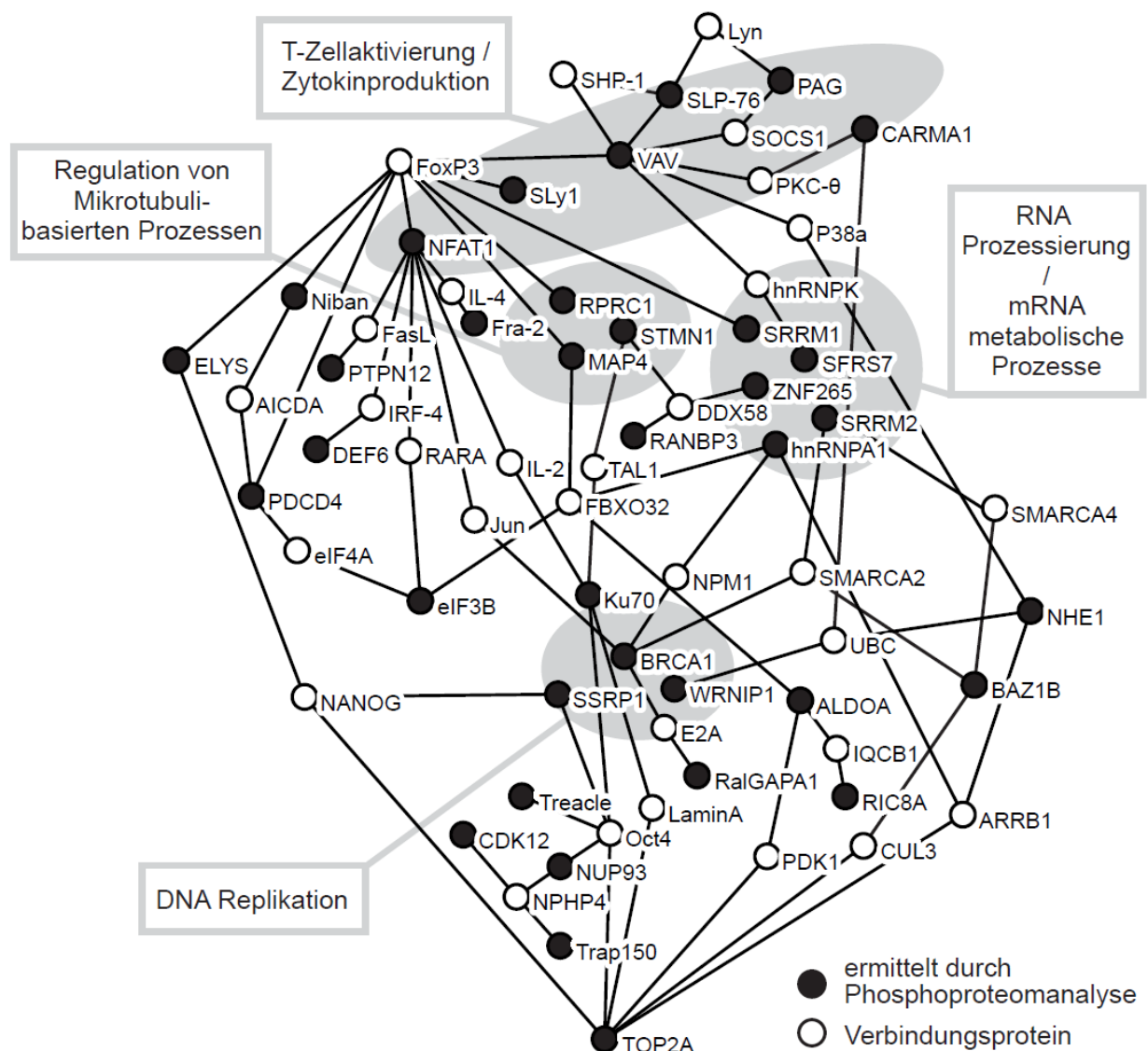


Abb. 12: CTLA-4-vermittelte Änderungen betreffen ein Netzwerk von Proteinen.

Die von CTLA-4 regulierten Proteine (Abb. 11) wurden mit einer Netzwerkanalyse-Software (Xia et al., 2014) hinsichtlich möglicher Interaktionen untersucht. Ausgefüllte Kreise symbolisieren Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit durch die Analyse des Phosphoproteoms von CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen identifiziert wurden, während offene Symbole durch die Software ermittelte Verbindungen darstellen. Die Proteine wurden nach den funktionell angereicherten GO:BP Gruppen (grau hinterlegt; vgl. Anlage 2) angeordnet.

Unter den zusätzlich ausgegebenen Proteinen hat der für regulatorische T-Zellen kritische Faktor FoxP3 mit 6 Interaktionsmöglichkeiten die meisten Verbindungen zu massenspektrometrisch ermittelten CTLA-4 Zielproteinen (Abb. 12; Lu et al., 2017; Rudra et al., 2012). Mit Hilfe der durchgeführten Analysen konnten neue Zielproteine von CTLA-4 in CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Die Auswertung des Datensatzes hat gezeigt, dass definierte zellbiologische Prozesse von CTLA-4 Signalen betroffen sind.

3.1.3 Der Transkriptionsfaktor Fos-related Antigen 2 (Fra-2, *Fos/2*) wird durch CTLA-4-Aktivierung dephosphoryliert

Unter den Proteinen mit mehreren unabhängig dephosphorylierten Stellen war der AP-1 Transkriptionsfaktor Fra-2 stark von CTLA-4 betroffen (Abb. 11). Die verringerte Phosphorylierung betraf dabei die Serinreste 120 und 200 (Anlage 1). Um das Ausmaß und den zeitlichen Verlauf der CTLA-4-abhängigen Dephosphorylierung von Fra-2 zu ermitteln, wurden nukleäre Extrakte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Fra-2 Antikörpers im Western Blot untersucht. Diese Methode ist dafür gut geeignet, da Fra-2 phosphorylierungsabhängig mehrere im Polyacrylamidgel unterschiedlich schnell migrierende Proteinfractionen ausbildet (Gruda et al., 1994).

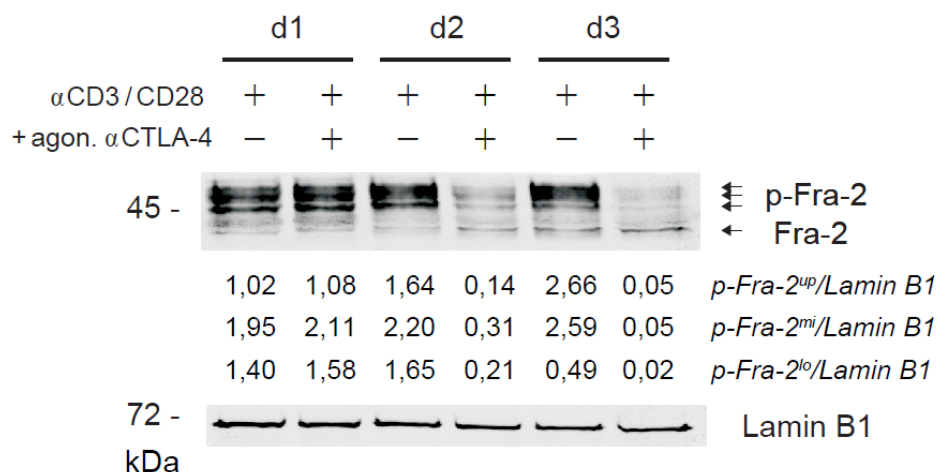


Abb. 13: CTLA-4 vermittelt die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors Fra-2.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. An den Tagen 1, 2 und 3 wurden die Proteine aus subzellulären Fraktionen extrahiert. Die nukleären Extrakte wurden mittels Western Blot auf Fra-2 und dessen Phosphorylierung untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der jeweiligen phosphorylierten Fraktionen im Verhältnis zu Lamin B1 (Ladekontrolle) an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Am Tag 1 konnte eine gleichstarke Fra-2 Phosphorylierung in Kontrollzellen und in CTLA-4-aktivierten Zellen in Form von drei ausgeprägten Proteinfractionen beobachtet werden (Abb. 13). Während dieses Phosphorylierungsprofil auch in den folgenden zwei Tagen in den Kontrollzellen vorhanden war, verursachte eine CTLA-4 Aktivierung zu diesen Zeitpunkten eine mehr als 7-fache Reduktion der phosphorylierten Fra-2 Proteine (Abb. 13). Um zu überprüfen, ob neben post-translationalen Modifikationen auch eine CTLA-4-vermittelte Regulation von Fra-2 auf transkriptioneller Ebene erfolgt, wurde die jeweilige Menge von *Fos/2* mRNA mittels quantitativer PCR bestimmt. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 14).

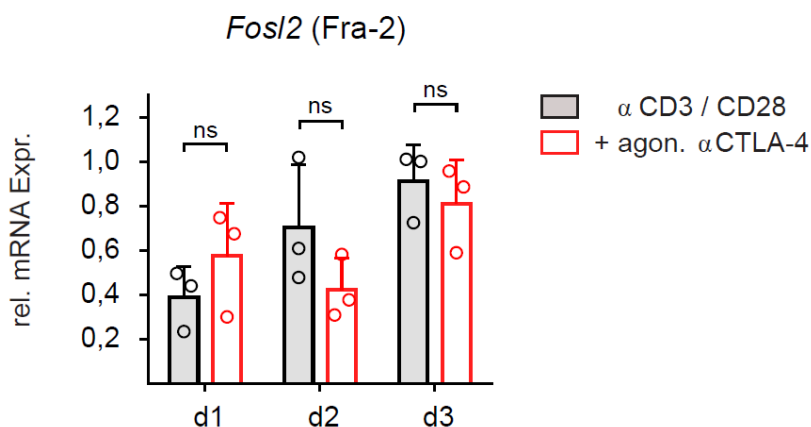


Abb. 14: Der Gehalt an *Fos/2* (Fra-2) mRNA ist von CTLA-4 unbeeinflusst.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. An den Tagen 1, 2 und 3 wurde die mRNA isoliert und mittels quantitativer PCR bezüglich *Fos/2* (Fra-2) Transkripte analysiert. Datenpunkte repräsentieren n=3 biologische Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; nach Berechnung durch Mann-Whitney Test.

Um die Phosphorylierung von Fra-2 genauer zu charakterisieren, wurde unter den in Frage kommenden Kinasen die Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) getestet (Gruda et al., 1994). Dazu wurden die jeweiligen CD8⁺ T-Zellansätze am Tag 2 für 60 min mit dem PKA Inhibitor 14-22 Amid oder mit der PKA-aktivierenden Substanz Forskolin inkubiert. Danach erfolgte eine Analyse der Fra-2 Phosphorylierungsprofile in den jeweiligen nukleären Extrakten mittels Western Blot. Der Inhibitor verursachte eine mehr als 30 %-ige Abnahme der oberen, langsam migrierenden sowie der unteren, schnell migrierenden phosphorylierten Proteinfraction in Kontrollzellen, während durch Forskolin dieses Phosphorylierungsprofil verstärkt ausgebildet wurde (Abb. 15A und B).

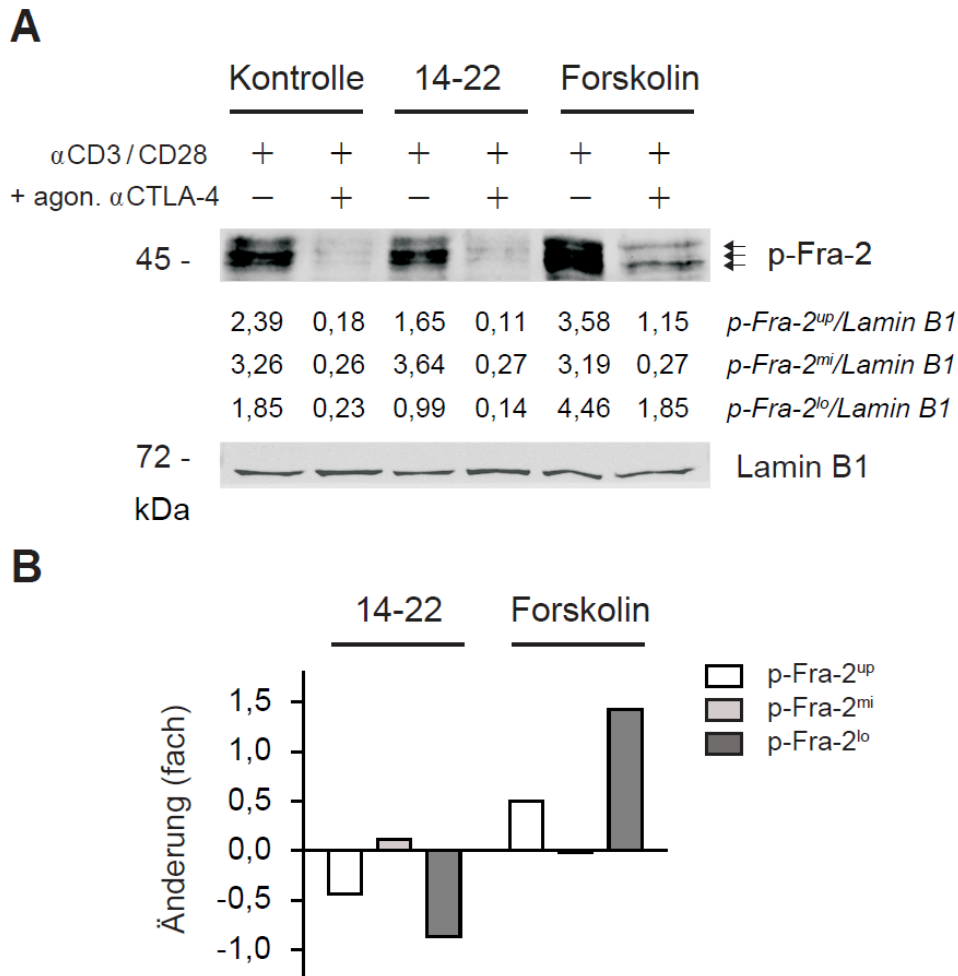


Abb. 15: Die Phosphorylierung von Fra-2 erfolgt unter Beteiligung von PKA.

(A) Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Nach 48 h wurden die Zellen für 60 min mit 14-22 Amid oder Forskolin inkubiert und danach die Proteine aus subzellulären Fraktionen extrahiert. Die nukleären Extrakte wurden mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von Fra-2 untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der jeweiligen phosphorylierten Fraktionen im Verhältnis zu Lamin B1 (Ladekontrolle) an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

(B) Die Intensitäten der jeweiligen phosphorylierten Fraktionen aus (A) wurden relativ zur Kontrolle berechnet und deren Änderung als Diagramm dargestellt.

Die Analyse der CTLA-4-abhängigen Phosphorylierung von Fra-2 im Western Blot bestätigt die massenspektrometrisch erhobenen Daten. Der CTLA-4 Effekt trat zeitlich übereinstimmend zur CTLA-4 Oberflächenexpression ein (Abb. 6 und 13). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kinase PKA in die CTLA-4-vermittelte Hypophosphorylierung von Fra-2 involviert ist.

3.1.4 Die CTLA-4-vermittelte Induktion von Programmed cell death-4 (PDCD4) führt zur Kontrolle der Proteintranslation

Ein primäres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von CTLA-4-vermittelten post-transkriptionalen und -translationalen Mechanismen in CD8⁺ T-Zellen. In diesem Zusammenhang konnte mittels Massenspektrometrie eine Anreicherung von Serin-94- und Serin-457-phosphorylierten Peptiden des Proteins „Programmed cell death-4“ (PDCD4) in CTLA-4-aktivierten Zellen detektiert werden ([Abb. 11](#); [Anlage 1](#)). Dieses Protein fungiert als Inhibitor der mRNA Translation wodurch es die Expression von Proteinen unabhängig von deren Gentranskription regulieren kann ([Yang et al., 2003](#)).

Die CTLA-4-abhängige Phosphorylierungsverstärkung von PDCD4 wurde zunächst mittels Western Blot weitergehend charakterisiert. Dazu wurden subzelluläre Fraktionen von CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen und Kontrollzellen sowohl auf Serin-457-phosphoryliertes als auch auf Gesamt-PDCD4 untersucht. In Kontrollzellen konnte an den Tagen 1, 2 und 3 nur eine geringe Konzentration an PDCD4 im Zytoplasma festgestellt werden ([Abb. 16](#)). Während in CTLA-4-aktivierten Zellen an Tag 1 die gleichen Verhältnisse wie in Kontrollzellen vorlagen, konnte jedoch an den Tagen 2 und 3 eine mehr als 4-mal so hohe PDCD4 Proteinmenge detektiert werden. Das Protein war fortlaufend phosphoryliert, wodurch die massenspektrometrisch detektierte Phosphorylierungsdifferenzen auf Unterschiede in der PDCD4 Proteinkonzentration zurückzuführen waren. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Lokalisation von PDCD4 im Zellkern festgestellt werden ([Abb. 16](#)).

PDCD4 kann die Proteintranslation über eIF4A-abhängige und -unabhängige Mechanismen hemmen ([Biyanee et al., 2015](#); [Fehler et al., 2014](#); [Yang et al., 2004](#)). Durch die Interaktion mit der RNA-Helikase eIF4A verhindert PDCD4 die weitere Anlagerung des Faktors eIF4G und unterbindet somit die Translationsinitiation. Um diesen Zusammenhang mit CTLA-4 zu überprüfen, wurde an Tag 2 in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen sowie in Kontrollzellen der Faktor eIF4A immunpräzipitiert. Danach erfolgte eine Analyse der gewonnenen Präzipitate mittels Western Blot, um die Menge von co-immunpräzipitiertem eIF4G und PDCD4 Protein festzustellen ([Kroczyńska et al., 2012](#)). Während in den Gesamtzelllysaten gleichhohe Mengen an eIF4G detektiert werden konnten, war in den Immunpräzipitaten von CTLA-4-

aktivierten WT CD8⁺ T-Zellen ein signifikant geringere Konzentration an eIF4G vorhanden (Abb. 17).

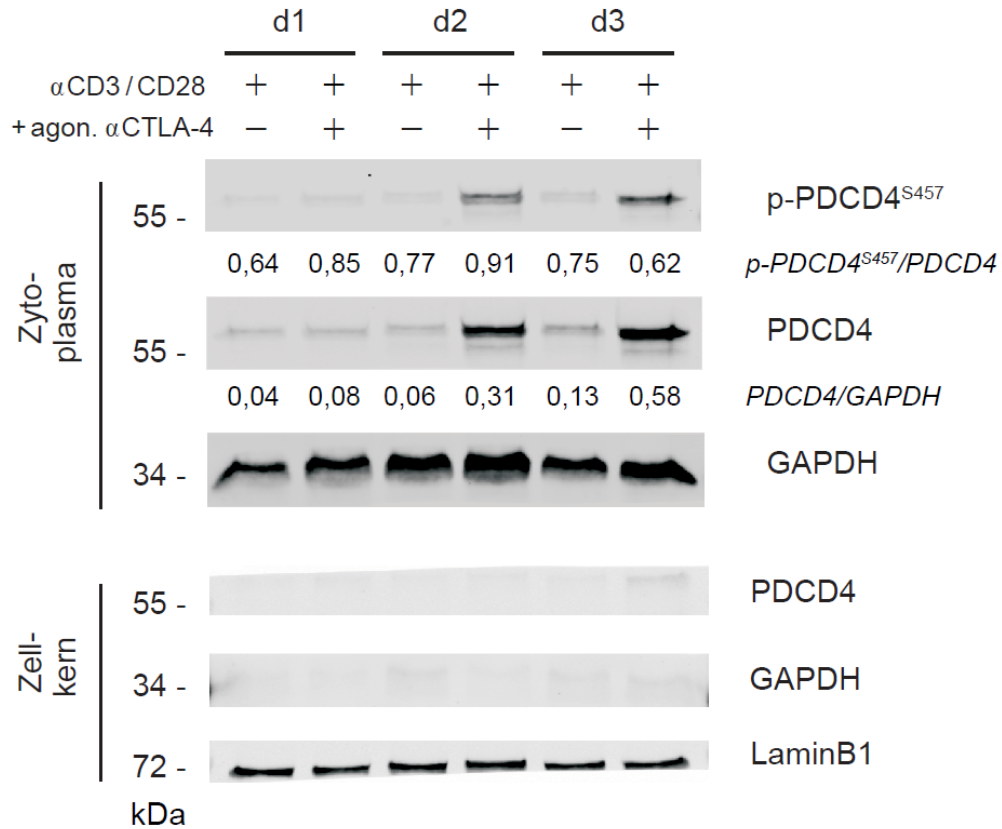


Abb. 16: Der Translationsinhibitor PDCD4 wird durch CTLA-4-Aktivierung induziert.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. An den Tagen 1, 2 und 3 wurden die Proteine aus subzellulären Fraktionen extrahiert. Die zytoplasmatischen bzw. nukleären Extrakte wurden mittels Western Blot auf PDCD4 und dessen Serin-457 Phosphorylierung untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu PDCD4 (Phosphorylierung) bzw. GAPDH (Ladekontrolle) im Zytoplasma an. Die Daten sind repräsentativ für n=5 unabhängige Experimente.

Zusammenfassend wird durch diese Daten gezeigt, dass eine CTLA-4 Aktivierung zu einer Anreicherung des Proteins PDCD4 im Zytoplasma von CD8⁺ T-Zellen führt, wo es die Translation von mRNA inhibieren kann. Ob CTLA-4 durch diesen Mechanismus wirkungsvoll die Immunantwort von CTL regulieren kann, sollte weiter untersucht werden.

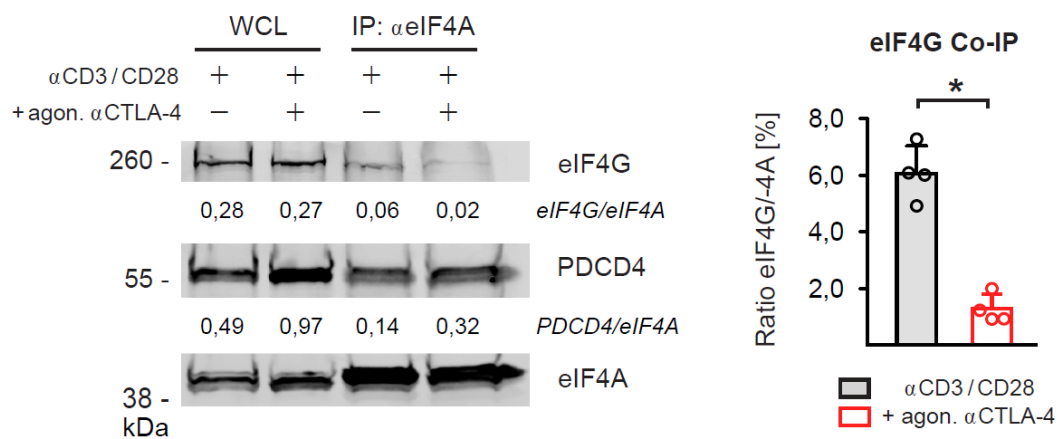


Abb. 17: CTLA-4-induziertes PDCD4 inhibiert die Translationsinitiation.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Nach 48 h wurde aus den jeweiligen Gesamtzellextrakten (WCL) eIF4A immunpräzipitiert (IP) und auf gebundenes eIF4G bzw. PDCD4 Protein mittels Western Blot untersucht (links). Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu eIF4A an. Die Quantifizierung von koimmunopräzipitierten eIF4G aus unabhängig wiederholten Experimenten wurde zusammengefasst ausgewertet (rechts). Datenpunkte repräsentieren n=4 biologische Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung, *p<0,05; nach Berechnung durch Mann-Whitney Test.

3.2 Die Bedeutung von PDCD4 für die CD8⁺ T-Zell-vermittelte und anti-tumorale Immunantwort

3.2.1 Die CTLA-4-vermittelte PDCD4 Induktion führt zu einer reduzierten IFN- γ -Produktion in antigen-spezifisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen

Im Rahmen der Charakterisierung von PDCD4 k.o. Mäusen wurde bereits gezeigt, dass in Kulturen mit PDCD4-defizienten Milzzellen nach polyklonaler Aktivierung mehr IL-4, -10 und IFN- γ im Überstand vorhanden war (Hilliard et al., 2006). Um die Expression und Funktion von PDCD4 in Antigen-aktivierten CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden TZR-transgene CD8⁺ T-Zellen von OT-I Mäusen mit oder ohne CTLA-4 bzw. PDCD4 Gendefekt verwendet. Diese Zellen besitzen einen für das OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (SIINFEKL) spezifischen TZR und wurden mit APZ und Ovalbumin stimuliert (Abb. 5B).

Mittels Western Blot Analyse von Gesamtzellextrakten aus gereinigten CD8⁺ T-Zellen wurde zunächst die Konzentration von PDCD4 bestimmt. In CTLA-4 WT Zellen konnte im Vergleich zu CTLA-4-defizienten Zellen zwischen Tag 2 und Tag 3 eine mehr als 3-fache Zunahme an PDCD4 detektiert werden, während das Protein fortlaufend an Serin 457 phosphoryliert war (Abb. 18).

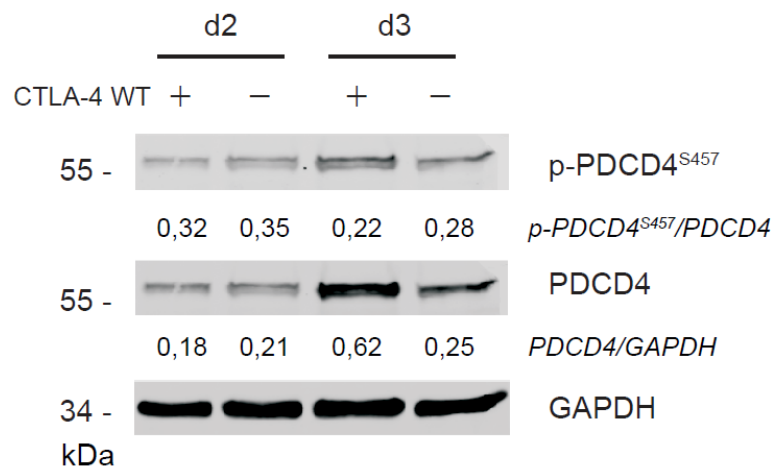


Abb. 18: CTLA-4-defiziente CD8⁺ T-Zellen sind in der Expression von PDCD4 beeinträchtigt.

Naive CD8⁺ TZR-transgene OT-I CTLA-4^{+/+} oder OT-I CTLA-4^{-/-} T-Zellen wurden mit APZ und Ovalbumin aktiviert. Am Tag 2 und 3 wurden Gesamtzellextrakte mittels Western Blot auf PDCD4 und dessen Serin-457 Phosphorylierung untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu PDCD4 (Phosphorylierung) bzw. GAPDH (Ladekontrolle) an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Des Weiteren wurde in den Antigen-spezifisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen die IFN- γ -Produktion, CTLA-4 Expression und Proliferation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. CTLA-4-defiziente Zellen wiesen im Vergleich zu Kontrollzellen am Tag 2 einen signifikant erhöhten Anteil an IFN- γ positiven Zellen auf (Abb. 19A). Übereinstimmend mit der zeitlichen Expression von PDCD4 in Kontrollzellen konnte in TZR-transgenen PDCD4-defizienten Zellen am Tag 3 eine signifikant erhöhte IFN- γ -Produktion festgestellt werden (Abb. 18 und Abb. 19A). Die PDCD4^{-/-} CD8⁺ Zellen zeigten keine abweichende CTLA-4 Expression (Abb. 19B). Ebenso konnte anhand der CFSE-Verdünnung eine vergleichbare Proliferation zwischen PDCD4-defizienten und Kontrollzellen verzeichnet werden (Abb. 19C).

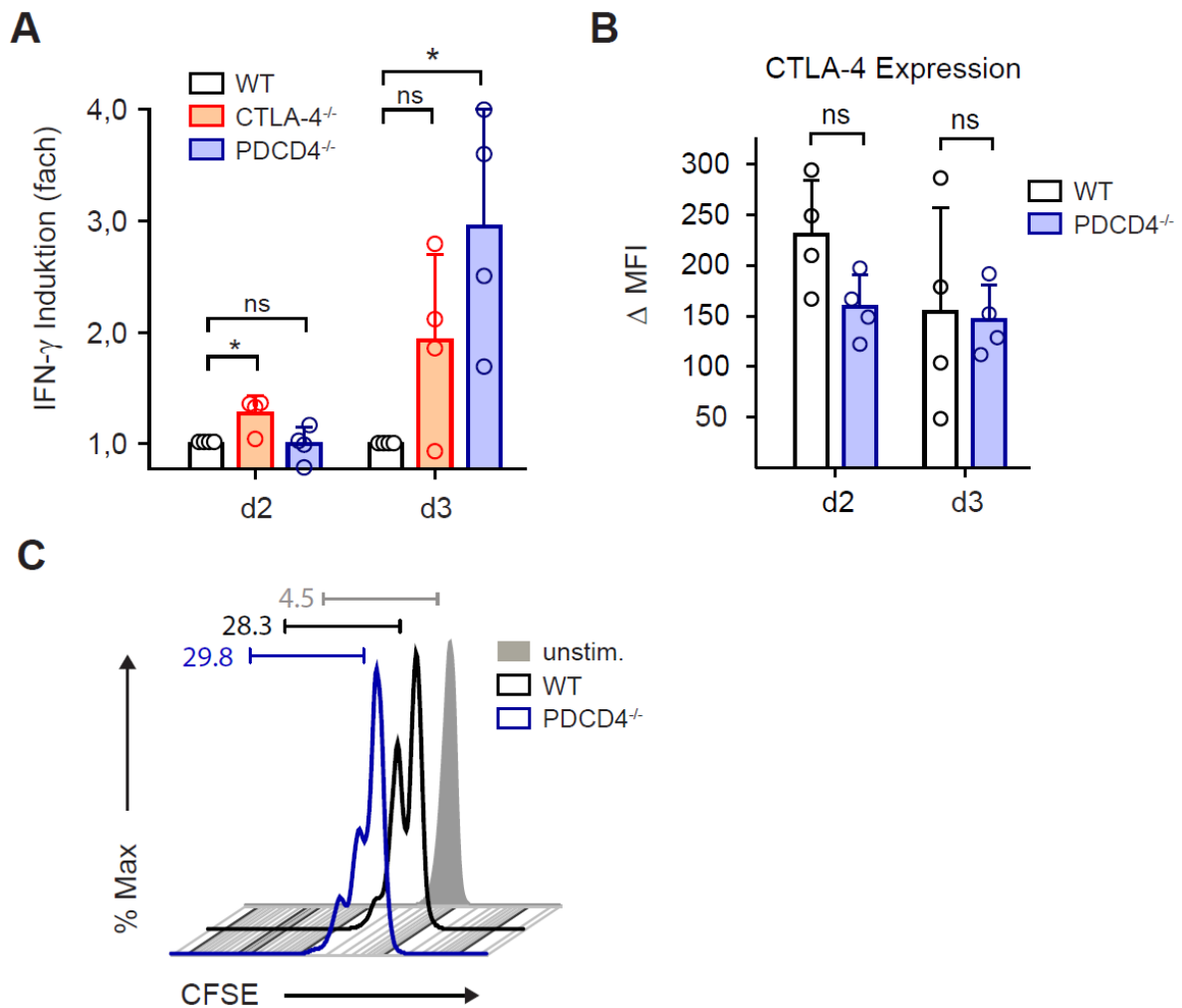


Abb. 19: PDCD4-defiziente Zellen weisen eine erhöhte Produktion von IFN- γ auf.

Naive TZR-transgene OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{+/+} oder OT-I CTLA-4^{-/-} PDCD4^{+/+} oder OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen wurden mit APZ und Ovalbumin aktiviert. Am Tag 2 oder 3 wurden die Zellen jeweils für 3h mit Brefeldin A inkubiert danach fixiert, intrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

(A) Die jeweiligen Anteile an IFN- γ -positiven CTLA-4- oder PDCD4-defizienten Zellen sind im Verhältnis zu normalisierten WT Zellen dargestellt.

(B) Die jeweilige CTLA-4 Expression wurde durch die Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität von CTLA-4 WT zu CTLA-4-defizienten Zellen bestimmt.

(C) Proliferation von TZR-transgenen OT-I PDCD4^{+/+} und OT-I PDCD4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Die Zellen wurde vor der Aktivierung mit CFSE beladen und am Tag 3 mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Daten sind repräsentativ für n=2-4 unabhängige Experimente. Datenpunkte repräsentieren biologische Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; *p<0,05; nach Berechnung durch Mann-Whitney bzw. Kruskal-Wallis Test.

Diese Messwerte zeigen, dass eine CTLA-4-abhängige Erhöhung der PDCD4 Expression physiologisch relevant sein könnte, da diese in CD8⁺ T-Zellen nicht nur durch agonistische anti-CTLA-4 Antikörper, sondern auch durch B7-Liganden erzeugt werden kann (Abb. 16 und Abb. 18). Im Folgenden stellte sich die Frage, ob CTLA-4-induziertes PDCD4 durch die Regulation der IFN- γ -Produktion eine kritische Funktion in CTL-Immunantworten ausführen kann.

3.2.2 Eine PDCD4 Defizienz verbessert die Kontrolle des Tumorwachstums in experimentellen Tiermodellen

Durch die Verabreichung von CTLA-4 blockierenden Antikörpern kann bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine signifikante Verbesserung der anti-tumoralen Immunantwort erzielt werden (Leach et al., 1996; Hurwitz et al., 1998; Phan et al., 2003). Daher wurde die Relevanz der CTLA-4-vermittelten PDCD4 Induktion im Kontext einer Immunantwort gegenüber Tumorzellen überprüft.

Zunächst sollten ein experimentelles System verwendet werden, bei welchem sich eine PDCD4-Defizienz nur auf die Tumorzell-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beschränkt. Dazu wurden CD45.1⁺ (Ly5.1) Empfängermäuse mit Ovalbumin-exprimierenden B16 Melanomzellen subkutan inokuliert. 5 Tage danach wurden diese durch einen adoptiven Transfer von naiven TZR-transgenen CD8⁺ T-Zellen aus CD45.2⁺ OT-I Spendermäusen behandelt. Die Spenderzellen waren entweder CTLA-4 und PDCD4 WT oder defizient für CTLA-4 oder PDCD4. Die darauffolgende Messung des Tumolvolumens zeigte keinen Unterschied im Tumorwachstum zwischen Tieren, die mit CTLA-4 und PDCD4 WT Zellen behandelt wurden und Kontrolltieren, welche keine CD8⁺ T-Zellen erhielten (Abb. 20A und B). Hingegen führte der Transfer CTLA-4- oder PDCD4-defizienter CD8⁺ T-Zellen zu einer Reduktion des Tumorwachstums. Die mit PDCD4-defizienten Zellen behandelten Mäuse wiesen 8 Tage nach Transfer im Vergleich zu Kontrolltieren ein durchschnittlich mehr als 5-fach verringertes Tumolvolumen auf (Abb. 20A und B).

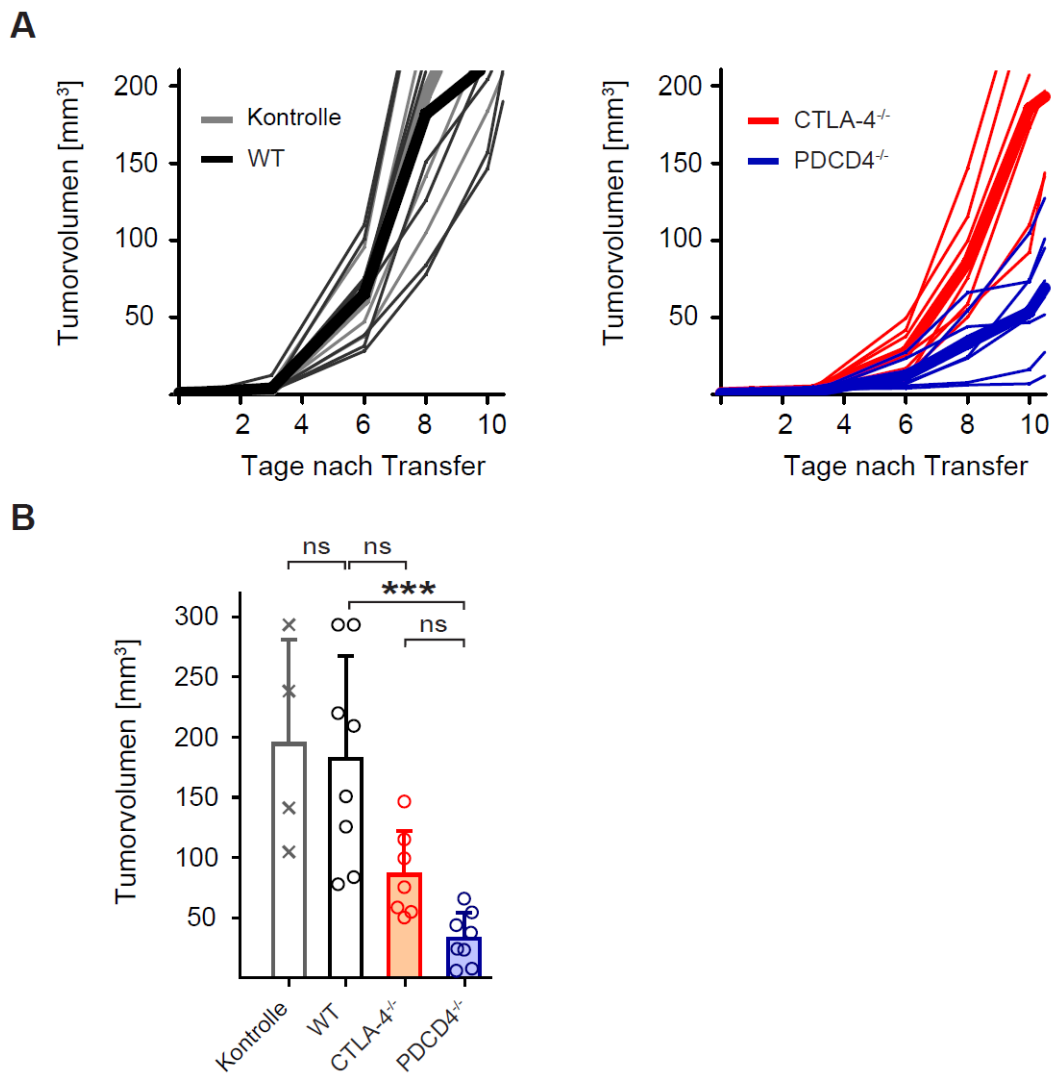


Abb. 20: PDCD4-defiziente CD8⁺ T-Zellen verlangsamen das Wachstum von transplantierten Melanomzellen.

(A) Tumorwachstumskurven von subkutan inokulierten Ovalbumin-exprimierenden Melanomzellen in Mäusen (n=4-8), denen 5 Tage nach der Tumorzellinjektion naive TZR-transgene OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{+/+} (schwarz) oder OT-I CTLA-4^{-/-} PDCD4^{+/+} (rot) oder OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{-/-} (blau) CD8⁺ T-Zellen intravenös transferiert wurden oder nicht (Kontrolle, grau). Dünne Linien repräsentieren einzelne Wachstumskurven und dicke Linien den jeweiligen Mittelwert.

(B) Vergleichende Darstellung des Tumorzellwachstums gemäß (A) am Tag 8 nach adoptivem T-Zelltransfer. Datenpunkte repräsentieren einzelne Mäuse mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; *p<0,05; ***p<0,001; nach Berechnung durch Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Korrektur.

Des Weiteren wurden von den Empfängermäusen am Tag 6 nach Transfer Blutproben entnommen, um die transferierten, aktivierten (CD45.2⁺, CD62L^{lo}) CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie zu charakterisieren. Im Vergleich zu Kontrolltieren konnte

kein signifikanter Unterschied in den prozentualen Anteilen (% von den gesamten CD8⁺ T-Zellen) festgestellt werden (Abb. 21A). Bei der Messung der IFN- γ -Produktion nach *ex vivo* Restimulation konnte jedoch eine signifikante Erhöhung bei transferierten PDCD4-defizienten CD8⁺ T-Zellen verzeichnet werden (Abb. 21B).

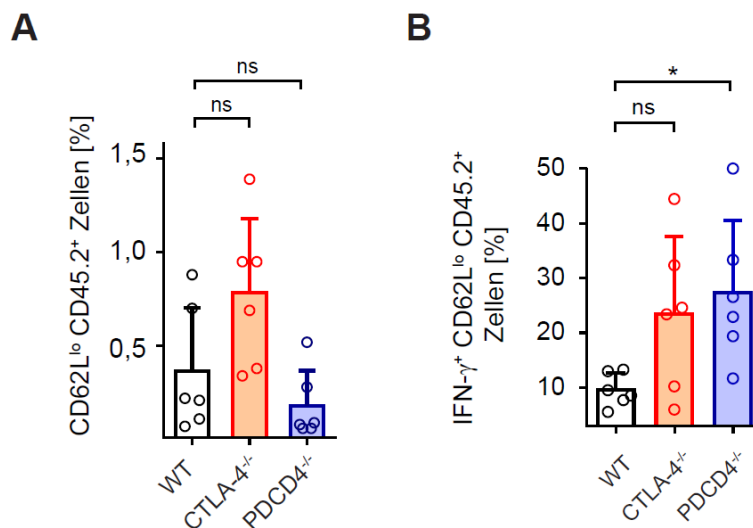


Abb. 21: Periphere transferierte PDCD4-defiziente CD8⁺ T-Zellen zeigen eine erhöhte IFN- γ -Produktion.

(A und B) CD45.1⁺ Mäuse wurden subkutan mit Ovalbumin-exprimierenden Melanomzellen inokuliert und 5 Tage danach durch intravenöse Injektion von CD45.2⁺ naiven TZR-transgenen OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{+/+} (WT, schwarz) oder OT-I CTLA-4^{-/-} PDCD4^{+/+} (rot) oder OT-I CTLA-4^{+/+} PDCD4^{-/-} (blau) CD8⁺ T-Zellen behandelt. Der prozentualen Anteile an aktivierten (CD62L^{lo}) transferierten Zellen (% von gesamten CD8⁺ T-Zellen) (A) sowie die Anteile an transferierten IFN- γ ⁺ Zellen (% von CD45.2⁺ CD62L^{lo} Zellen) (B) wurden am Tag 6 nach Transfer in Blutproben mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Datenpunkte repräsentieren einzelne Mäuse mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; *p<0,05; nach Berechnung durch Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Korrektur.

Da eine Verabreichung von CTLA-4 blockierenden Antikörpern global und nicht nur isoliert auf CD8⁺ T-Zellen wirkt, sollten in einem weiterführenden Experiment die Auswirkung einer systemischen PDCD4-Defizienz getestet werden. Dazu wurden in einem Modell mit Prostatakarzinomzellen (Kwon et al., 1997) WT und PDCD4-defiziente Mäuse mit TRAMP-C1 Zellen subkutan inokuliert. Bei einem Teil der WT Mäuse wurde zu Kontrollzwecken eine Behandlung mit blockierenden anti-CTLA-4 Antikörpern vorgenommen. Bei der darauffolgenden Untersuchung des Tumorwachstums bzw. der Tumorabstoßung konnte festgestellt werden, dass sowohl PDCD4-defiziente als auch mit blockierenden anti-CTLA-4 Antikörpern behandelte WT

Mäuse die transplantierten Prostatakarzinomzellen stärker abstießen als unbehandelte WT Mäuse. Während bei letzteren innerhalb von 14 Tagen nur drei von 9 Mäusen tumorfrei waren, konnte in dieser Zeitspanne bereits bei allen PDCD4-defizienten Mäuse kein Tumor mehr detektiert werden (Abb. 22).

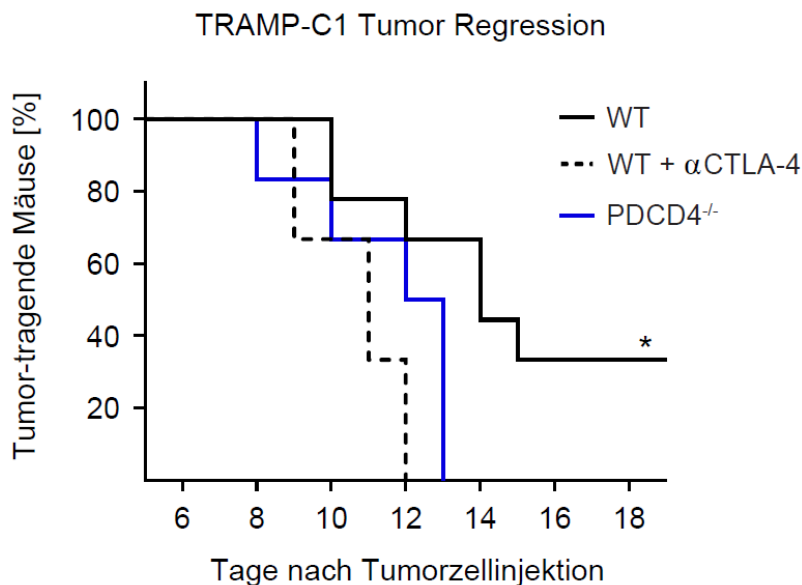


Abb. 22: Das systemische Fehlen von PDCD4 begünstigt die Tumorabstoßung von transplantierten Prostatakarzinomzellen.

WT oder PDCD4-defiziente Mäuse wurden subkutan mit Luciferase-exprimierenden TRAMP-C1 Prostatakarzinomzellen inokuliert und danach bezüglich der Tumorabstoßung kontrolliert. Dargestellt sind die prozentuale Anteile an TAMP-C1 Tumor-tragenden WT (n=9) oder PDCD4-defizienten (n=6) Mäusen sowie WT Mäusen, welche an den Tagen 6, 10 und 13 nach Tumoringokulation mittels intraperitonealer Injektion eines CTLA-4 blockierenden Antikörpers behandelt wurden (n=3), *p<0,05; nach Berechnung durch Logrank- (Mantel-Cox-) Test.

Die Untersuchung der PDCD4-defizienten CD8⁺ T-Zellen und Mäuse in experimentellen Tumormodellen haben erste Hinweise für die Relevanz und Funktion des CTLA-4 Ziels PDCD4 in anti-tumoralen Immunantworten gegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl eine selektive als auch globale PDCD4 Defizienz eine vergleichbare Wirkung wie eine CTLA-4 Blockade auf anti-tumorale Immunantworten entfalten. Dadurch könnte PDCD4 als wichtiger CTLA-4-induzierter Immun-Checkpoint in CD8⁺ T-Zellen fungieren.

3.3 Der CTLA-4-vermittelte Mechanismus der PDCD4 Induktion

3.3.1 Die Aktivierung von CTLA-4 bewirkt eine Erhöhung von *Pdcd4* mRNA

Als Inhibitor der Proteintranslation kann PDCD4 auf verschieden Art und Weise reguliert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die PDCD4 Konzentration durch dessen Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradation gesteuert wird (Dorrello et al., 2006; Kroczyńska et al., 2012). Um zu überprüfen, ob CTLA-4 durch diesen Mechanismus die Menge an PDCD4 reguliert, wurden die CTLA-4-aktivierte CD8⁺ T-Zellen und Kontrollzellen am Tag 2 für 2 h mit dem Proteasomeninhibitor MG132 inkubiert. Danach erfolgte eine Analyse der PDCD4 Expression sowie der Proteinubiquitinierung mittels Western Blot. Die mit MG132 behandelten Proben zeigten eine starke Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen, was die Wirksamkeit der proteasomalen Inhibition belegte (Abb. 23). Diese führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der PDCD4 Proteinkonzentration in Kontrollzellen im Vergleich zu gleichbehandelten CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen (Abb. 23).

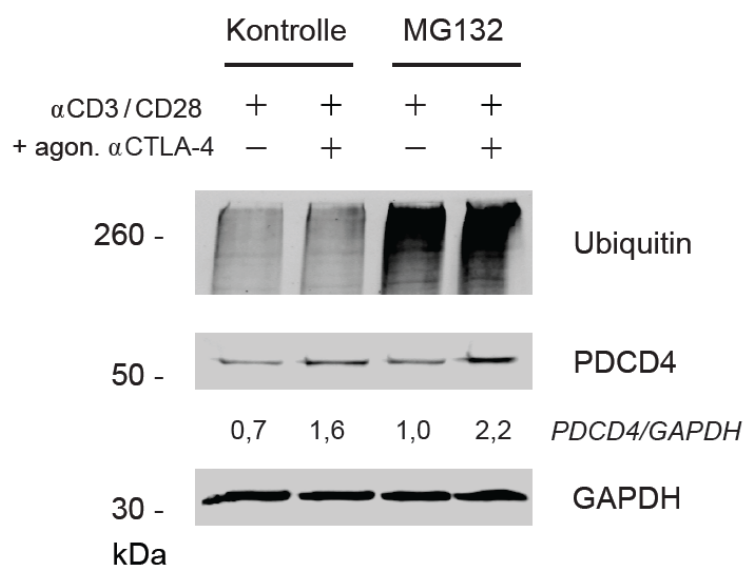


Abb. 23: Die CTLA-4-vermittelte PDCD4 Induktion erfolgt unabhängig von der Proteindegradation.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Am Tag 2 wurden Gesamtzellextrakte von Kontrollzellen und Zellen, welche für 2 h mit dem Proteasominhibitor MG-132 inkubiert wurde, mittels Western Blot auf die Ubiquitinierung von Proteinen sowie auf die PDCD4 Proteinkonzentration untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu GAPDH (Ladekontrolle) an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Des Weiteren sind *Pdcd4* Transkripte ein Ziel von micro-RNA 21 (*miR-21*), wodurch die *Pdcd4* mRNA Translation und Stabilität negativ reguliert sein kann (Davis et al., 2008). Um zu überprüfen ob *miR-21* an der CTLA-4-vermittelten PDCD4 Regulation beteiligt ist, wurde die Menge von *miR-21* in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen sowie in Kontrollzellen bestimmt. Die Analyse ergab, dass zwischen den beiden Ansätzen kein signifikanter Unterschied in der *miR-21* Expression bestand (Abb. 24 links). Anschließend wurde ebenso die *Pdcd4* mRNA Konzentration in den jeweilig verschiedenen aktivierten Zellen ermittelt. Während am Tag 1 eine gleichhohe PDCD4 mRNA Menge vorhanden war, bewirkte eine CTLA-4 Aktivierung eine signifikant Erhöhung von *Pdcd4* Transkripten an den Tagen 2 und 3 (Abb. 24 rechts).

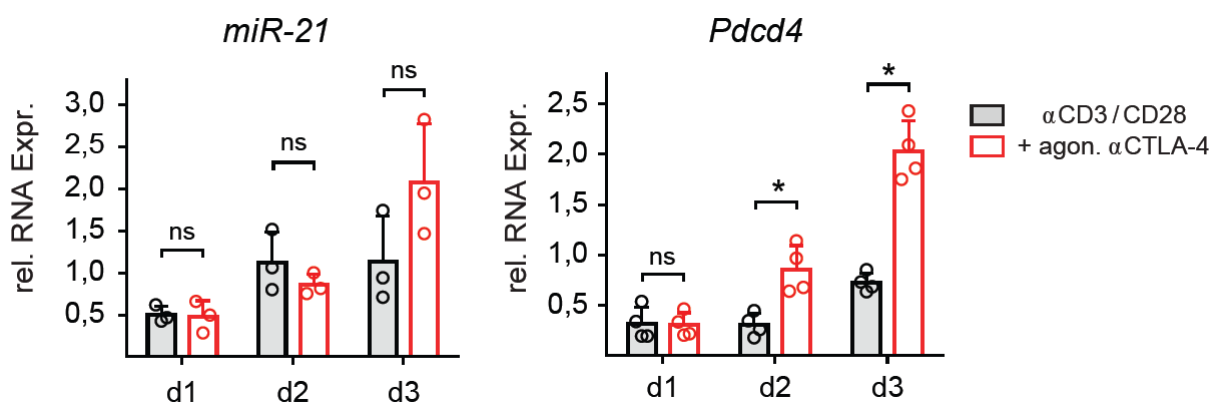


Abb. 24: CTLA-4 induziert PDCD4 durch Erhöhung der Genexpression.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Am Tag 1, 2 und 3 wurde die micro-RNA bzw. mRNA isoliert und mittels quantitativer PCR bezüglich *miR-21* (links) oder *Pdcd4* Transkripte (rechts) analysiert. Die Daten sind repräsentativ für n=3 (*miR-21*) oder n=4 (*Pdcd4*) unabhängige Experimente. Datenpunkte repräsentieren biologische Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; *p<0,05; nach Berechnung durch Mann-Whitney Test.

Anhand der durchgeführten Analysen konnte der Mechanismus der CTLA-4-vermittelten Regulation der PDCD4 Proteinkonzentration eingegrenzt werden. Einerseits fand kein Einfluss von CTLA-4-vermittelten Signalen auf die proteasomale Degradation von PDCD4 statt. Zum Anderen konnte eine CTLA-4-abhängige Regulation von PDCD4 durch *miR-21* ausgeschlossen werden. Die Korrelation von CTLA-4-induzierten *Pdcd4* Transkripten zur korrespondierenden Menge an PDCD4 Protein implizieren die Kontrolle der PDCD4 Proteinexpression durch Regulation der *Pdcd4* mRNA Konzentration.

3.3.2 Die Induktion von PDCD4 ist von der Reaktivierung des Transkriptionsfaktors Forkhead box protein O1 (FoxO1) abhängig

Die CTLA-4-vermittelte Erhöhung der *Pdcd4* mRNA Menge könnte in CD8⁺ T-Zellen durch eine Transkriptionsfaktor-induzierte *Pdcd4* Genexpression erfolgen. In dieser Hinsicht wurde spezieübergreifend eine Bindung und aktivierende Wirkung des Faktors FoxO bzw. FoxO1 im *Pdcd4* Promotor festgestellt (Olson et al., 2013; Ouyang et al., 2012). Um eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors FoxO1 an der CTLA-4-vermittelten Induktion von PDCD4 in CD8⁺ T-Zellen zu überprüfen, wurden diese mit oder ohne zusätzliches CTLA-4 Signal aktiviert und nach 24 h mit dem FoxO1 Inhibitor AS1842856 inkubiert. Am Tag 2 wurden die jeweiligen Gesamtzellextrakte gewonnen und die PDCD4 Expression mittels Western Blot analysiert. Im Vergleich zu Kontrollzellen fiel die CTLA-4-vermittelte Erhöhung der PDCD4-Proteinkonzentration in AS1842856-behandelten CD8⁺ T-Zellen 5-mal schwächer aus (Abb. 25).

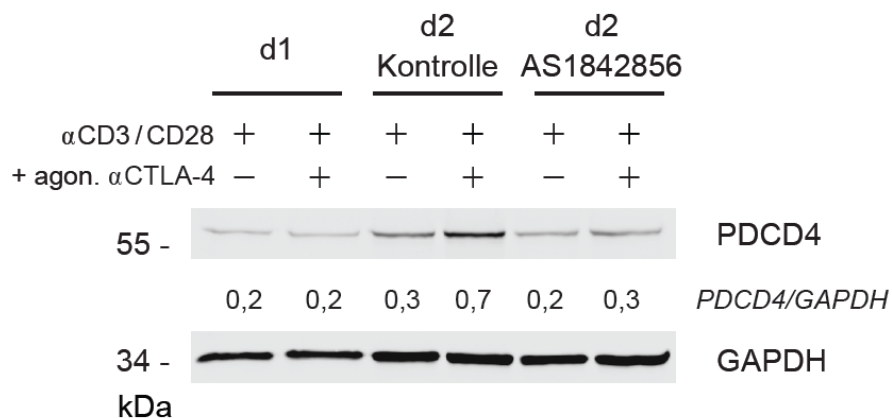


Abb. 25: Die Inhibition von FoxO1 unterbindet die CTLA-4-abhängige Induktion von PDCD4.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Am Tag 1 wurde ein Teil der Zellen mit dem FoxO1 Inhibitor AS1842856 für 24 h inkubiert. Die Gesamtzellextrakte wurden am Tag 1 und 2 mittels Western Blot auf die Konzentration von PDCD4 untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu GAPDH (Ladekontrolle) an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Um die Verbindung von FoxO1 zu PDCD4 eindeutig zu belegen, wurden die Auswirkungen eines konditionalen *Foxo1* Genverlust in CD8⁺ T-Zellen überprüft. Dabei wurden CD8⁺ T-Zellen von *Foxo1*^{fl/fl} Mäusen mit TAT-Cre Rekombinase

behandelt oder nicht, und nach CD3-, CD28- und CTLA-4-Aktivierung auf deren PDCD4- und FoxO1-Konzentrationen mittels Western Blot untersucht. Im Vergleich zu Kontrollzellen konnte in TAT-Cre behandelten Zellen eine mehr als 40 %-ige Reduktion der Menge an FoxO1 und PDCD4 Proteinen festgestellt werden (Abb. 26A). Des Weiteren erfolgte eine Analyse der IFN- γ -Produktion mittels Durchflusszytometrie, bei welcher TAT-Cre behandelte CD8⁺ T-Zellen einen mehr als doppelt so hohen Anteil an IFN- γ -positiven Zellen aufwiesen (Abb. 26B).

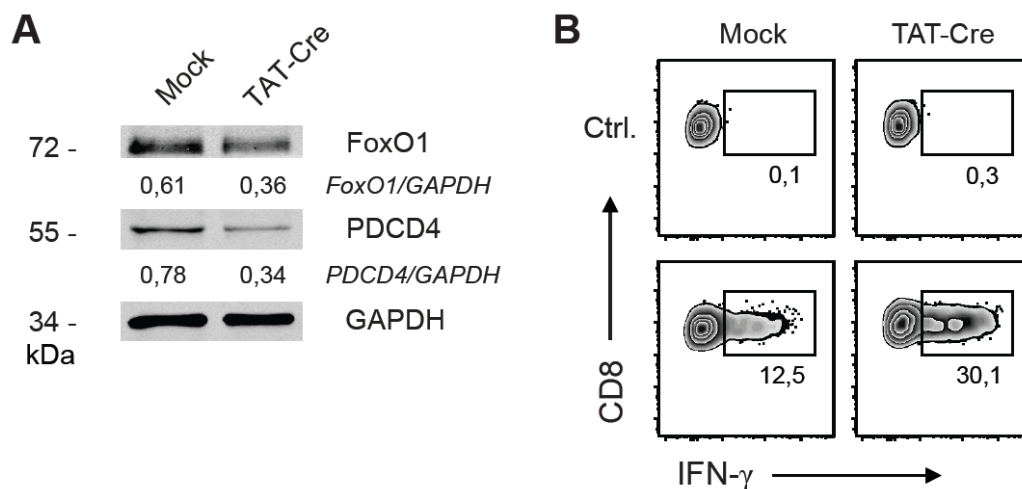


Abb. 26: Die Deletion von *Foxo1* führt zu einer verringerten PDCD4 Expression.

Naive Foxo1^{fl/fl} CD8⁺ T-Zellen wurden mit TAT-Cre Rekombinase behandelt und durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 und CTLA-4 aktiviert. (A) Am Tag 2 wurden Gesamtzellextrakte mittels Western Blot auf den die FoxO1- und PDCD4-Konzentration untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu GAPDH (Ladekontrolle) an.

(B) Die Zellen wurden bezüglich ihrer IFN- γ -Produktion mittels Durchflusszytometrie an Tag 2 untersucht. Zahlen geben die jeweiligen prozentualen Anteile an.

Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Der Transkriptionsfaktor FoxO1 spielt u.a. wegen der Induktion der *Tcf7* (TCF-1) Genexpression eine Rolle bei der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen (Hess Michelini et al., 2013; Tiemessen et al., 2014; Zhou et al., 2010). Als weiterführende Untersuchung der CTLA-4-vermittelten FoxO1 Aktivität wurden die Mengen an *Tcf7* Transkripten in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen und Kontrollzellen mittels quantitativer PCR bestimmt. Die Analyse ergab eine signifikant erhöhte *Tcf7* mRNA Menge in CTLA-4-aktivierten Zellen an Tag 2 und Tag 3 (Abb. 27).

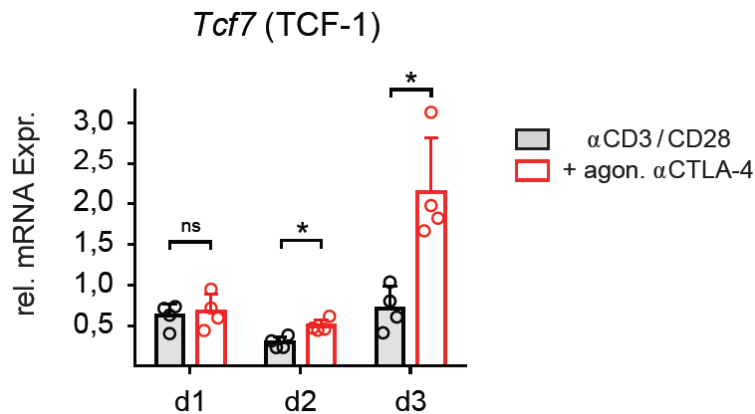


Abb. 27: Das FoxO1 Zielgen *Tcf7* (TCF-1) wird durch CTLA-4 induziert.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Am Tag 1, 2 und 3 wurde die mRNA isoliert und mittels quantitativer PCR bezüglich *Tcf7* (TCF-1) Transkripte analysiert. Die Daten sind repräsentativ für n=4 unabhängige Experimente. Datenpunkte repräsentieren biologische Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; *p<0,05; nach Berechnung durch Mann-Whitney Test.

Im Rahmen der T-Zellaktivierung wird FoxO1 durch einen hochgradig konservierten Mechanismus reguliert. Bei diesem kommt es zu einer Akt-vermittelten Phosphorylierung von FoxO1, u.a. an Serin 253, welche einen nukleären Export und somit die Inaktivierung von FoxO1 bewirkt (Biggs et al., 1999; Hedrick et al., 2012). Um die Wirkung CTLA-4-vermittelter Signale auf FoxO1 in CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden die subzellulären Extrakte von CTLA-4-aktivierten Zellen und Kontrollzellen mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde die zelluläre Lokalisation von FoxO1 bzw. die Phosphorylierung von FoxO1 und Akt bestimmt. 6 h nach Aktivierungsbeginn konnte bei beiden Ansätzen eine gleichstarke Phosphorylierung von FoxO1 an Serin 253 bzw. von Akt an Threonin 308 und Serin 473 festgestellt werden (Abb. 28). Übereinstimmend lag FoxO1 fast ausschließlich im Zytoplasma vor. Dagegen war am Tag 2 weder FoxO1 noch Akt an den jeweiligen Stellen phosphoryliert. Des Weiteren kam es zu einer Erhöhung des Gehalts von FoxO1 im Zellkern, wobei diese in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen mehr als doppelt so stark ausfiel als in Kontrollzellen (Abb. 28).

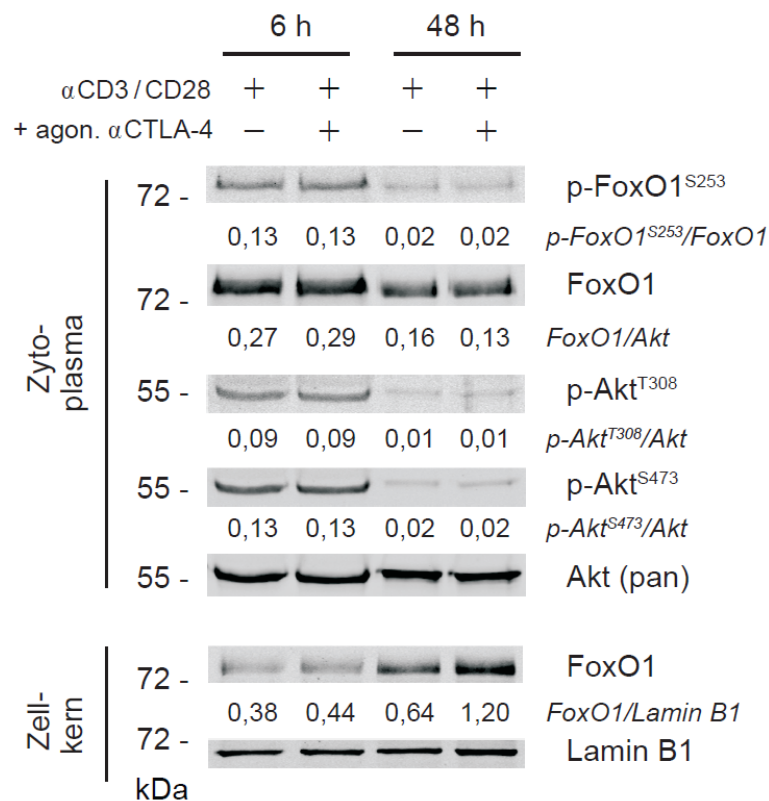


Abb. 28: CTLA-4-vermittelte Signale bewirken eine Reaktivierung von FoxO1.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert. Nach 6 und 48 h wurden die Proteine aus subzellulären Fraktionen extrahiert. Die zytoplasmatischen bzw. nukleären Extrakte wurden mittels Western Blot auf FoxO1 und dessen Serin-253 Phosphorylierung sowie auf Akt und dessen Threonin-308 sowie Serin-473 Phosphorylierung untersucht. Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu FoxO1 (Phosphorylierung) bzw. Akt (Phosphorylierung / Ladekontrolle) im Zytoplasma sowie zu Lamin B1 (Ladekontrolle) im Zellkern an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Neben Akt wurde in T-Zellen auch ein Einfluss von PKC- θ auf FoxO1 nachgewiesen (Ma et al., 2012). Zur Überprüfung der Wirkung von PKC- θ auf die Relokalisation des Faktors FoxO1 wurde dessen Verteilung in subzellulären Extrakten in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen und Kontrollzellen an Tag 2 mittels Western Blot untersucht. Vor der Gewinnung der Lysate wurden die Zellen für 60 min mit dem PKC-Inhibitor Rottlerin inkubiert. Bei CD8⁺ T-Zellen, welche neben einer CD3- und CD28-Aktivierung ein CTLA-4 Signal erhielten, konnte durch die Zugabe von Rottlerin eine verstärkte Akkumulation von FoxO1 im Zellkern unterbunden werden (Abb. 29A). Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit der PKC- θ Aktivität von CTLA-4 Signalen anhand der PKC- θ Threonin-538 Phosphorylierung mittels Western Blot überprüft (Wang et al., 2012).

Dabei konnte eine verstärkte PKC- θ Phosphorylierung an Tag 2 in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden (Abb. 29B).

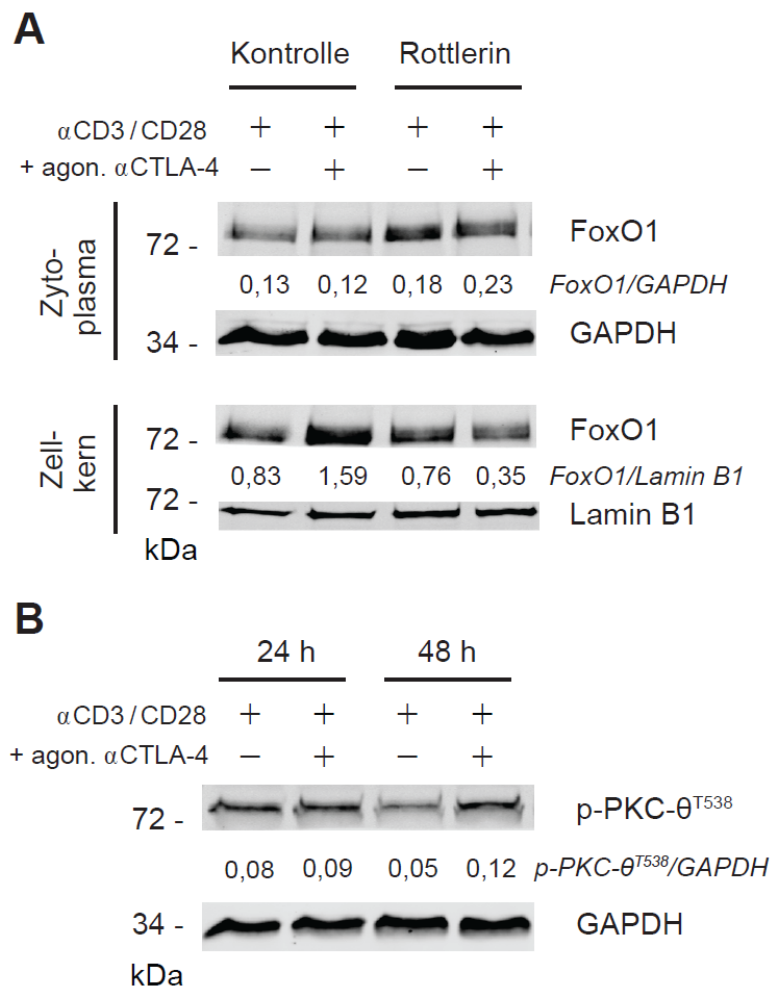


Abb. 29: Die CTLA-4-induzierte Reaktivierung von FoxO1 wird durch PKC vermittelt.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 oder zusätzlich gegen CTLA-4 aktiviert.

(A) Am Tag 2 wurden subzelluläre Extrakte von Kontrollzellen und Zellen, welche für 2 h mit 5 μ M Rottlerin inkubiert wurden, mittels Western Blot auf FoxO1 untersucht.

(B) Nach 24 und 48 h wurden Gesamtzellextrakte mittels Western Blot auf PKC- θ -Threonin-538-Phosphorylierung untersucht.

Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu GAPDH bzw Lamin B1 (Ladekontrollen) an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Zusammenfassend konnte durch diese Daten gezeigt werden, dass die CTLA-4 vermittelte Induktion des Translationsinhibitors PDCD4 in CD8⁺ T-Zellen durch eine Reaktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 bewirkt wird. Die Kontrolle der subzellären Verteilung von FoxO1 erfolgt dabei nicht durch Akt, sondern in Abhängigkeit von PKC-Signalen. Letztere regulieren eine CTLA-4-abhängige

Relokalisation von FoxO1 in den Zellkern, wo dieser u.a. die Genexpression von *Pdcd4* und *Tcf7* (TCF-1) anschaltet.

3.4 PDCD4 reguliert die Translation spezifischer mRNAs in CD8⁺ T-Zellen

Die Bindung von PDCD4 an mRNA ist eine kritische Voraussetzung zur Inhibition der Proteintranslation (Wedeken et al., 2010). Um die von PDCD4 in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen gebundenen Transkripte zu identifizieren, wurde PDCD4 in Zelllysaten immunpräzipitiert und die isolierte RNA aus den Präzipitaten mittels „Next Generation Sequencing“ analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu Kontrollpräzipitaten, die mRNA von 21 Genen signifikant verstärkt an PDCD4 gebunden waren. Das PDCD4-gebundene Transkript mit der höchsten Signifikanz codiert das Stoffwechsellenzym Glutaminase (*Gls*) (Abb. 30). Dieses Enzym spielt durch die Bereitstellung von Glutamat als wichtige Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle eine kritische Rolle bei der Ausführung von CD8⁺ T-Zelleffektorfunktion (Carr et al., 2010; Wang et al., 2011).

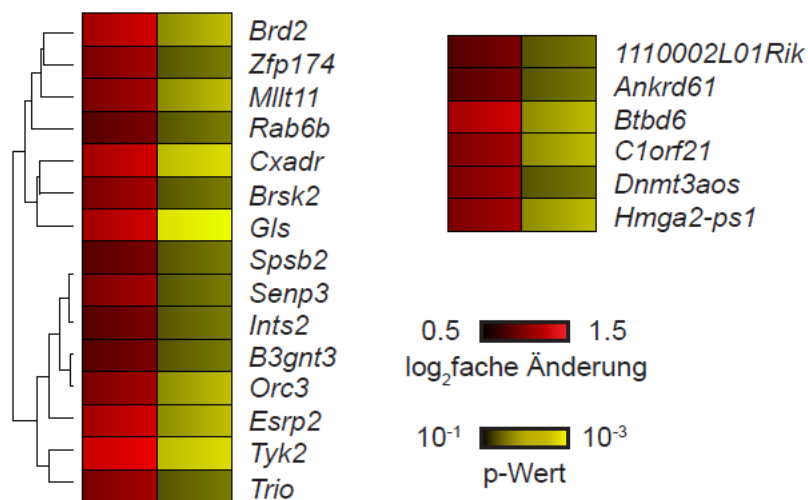


Abb. 30: PDCD4-gebundene RNAs in CD8⁺ T-Zellen.

Naive CD8⁺ T-Zellen wurden durch an Mikrosphären gekoppelte agonistische Antikörper gegen CD3, CD28 und CTLA-4 stimuliert. Am Tag 2 wurde PDCD4 immunpräzipitiert und die gebundene RNA mittels Next-Generation-Sequencing analysiert und im Vergleich zu einer Kontrollpräzipitation quantifiziert. Dargestellt sind die zusammengefassten Anreicherungen der jeweiligen RNAs in PDCD4-Präzipitaten, die in zwei unabhängigen Experimenten auftraten (rot, log₂fache Werte) sowie die jeweiligen p-Werte der Signifikanzen (gelb). Die Anordnung erfolgte anhand von GO:BP semantischen Verwandtschaftsgraden (Mazandu und Mulder, 2013).

Um die erst spät in der Differenzierung auftretenden PDCD4-vermittelten Effekte auf die Glutaminase-Expression genauer zu charakterisieren, wurden TCR-transgene CD8⁺ T-Zellen mit OVA-I/MHC-I und kostimulatorischen Molekülen sowie CTLA-4-aktivierender Antikörper beladenen Mikrosphären stimuliert (Abb. 5C). Dieses Aktivierungssystem ermöglicht eine längere Kultivierung *in vitro* und schließt eine Kontamination von Zelllysaten durch APZ aus. Zur Untersuchung der Wirkung von PDCD4 auf die mRNA Translation von Glutaminase, wurde die *Gls* mRNA Konzentration mit der entsprechenden Proteinexpression in OT-I PDCD4^{+/+} und OT-I PDCD4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen verglichen. Mittels Western Blot konnte dabei eine mehr als 50 %-ig verringerte Menge an zytoplasmatischen Glutaminase-Protein in PDCD4 WT CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Abb. 31A). Dieser Unterschied lag jedoch nicht bei der Konzentration von *Gls* mRNA vor (Abb. 31B).

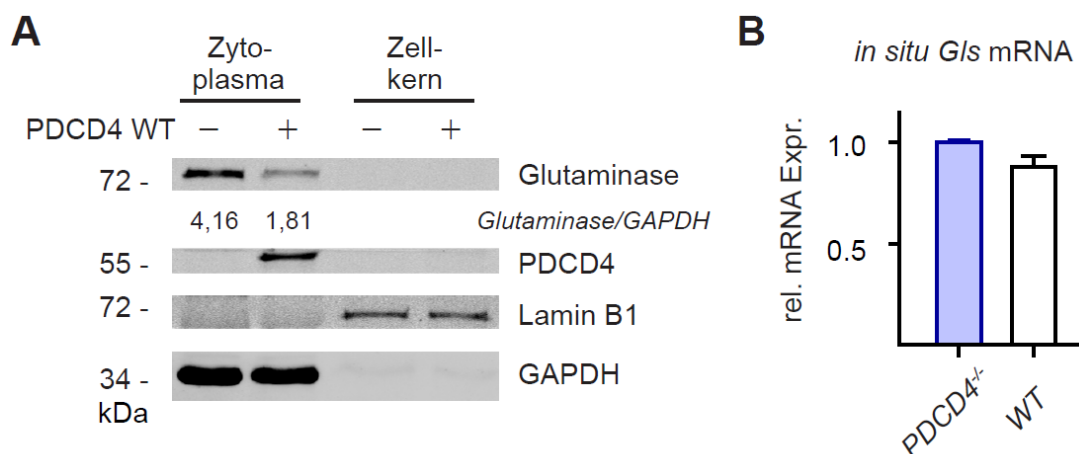


Abb. 31: PDCD4 inhibiert die Translation des Enzyms Glutaminase (*Gls*).

Naive TZR transgene OT-I PDCD4^{+/+} (WT) oder OT-I PDCD4^{-/-} wurden durch OVA-I-Peptid beladene, an Mikrosphären gekoppelte chimäre MHC-I- und B7-Proteine sowie agonistischen Antikörpern gegen CTLA-4 aktiviert.

(A) Am Tag 5 wurden subzelluläre Extrakte mittels Western Blot auf die Menge an zytoplasmatischer Glutaminase untersucht.

(B) Am gleichen Tag wurde die mRNA isoliert und mittels quantitativer PCR bezüglich der korrelierenden Glutaminase (*Gls*) Transkripte analysiert.

Zahlen geben die jeweiligen molekularen Gewichte der Proteinleiter (kDa, links) oder die relativen Intensitäten der Proteinbanden im Verhältnis zu GAPDH (Ladekontrolle) an. Die Daten sind repräsentativ für n=2 unabhängige Experimente.

Zur Untersuchung der Relevanz der PDCD4-vermittelten Regulation von Glutaminase für CD8⁺ T-Zelleffektorfunktionen, wurden aktivierte OT-I PDCD4^{+/+} und OT-I PDCD4^{-/-}

CD8⁺ T-Zellen mit oder ohne Glutamat, dem Produkt der von Glutaminase vermittelten Reaktion, kultiviert. Anschließend erfolgte eine Analyse der IFN- γ -Produktion mittels Durchflusszytometrie. Dabei konnte in PDCD WT Zellen eine mehr als 3-mal so starke Glutamat-abhängige Induktion der IFN- γ -Produktion im Vergleich zu PDCD4 k.o. Zellen festgestellt werden (Abb 32).

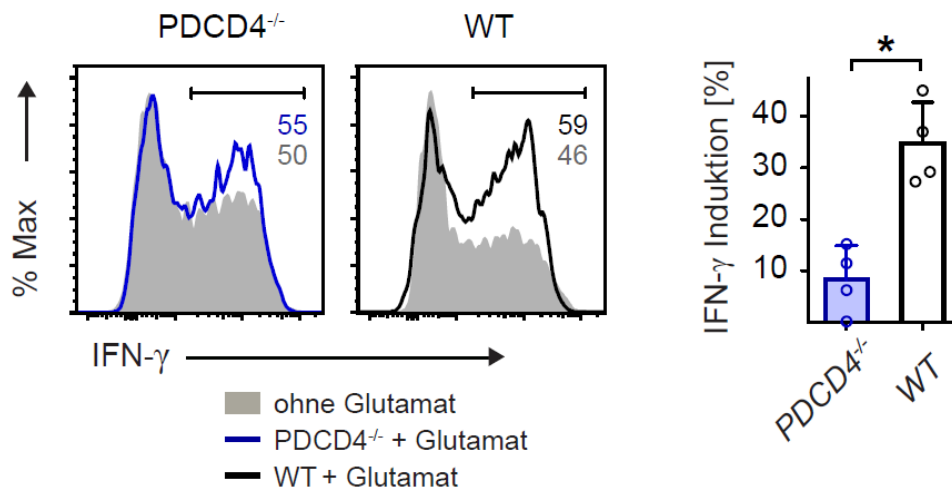


Abb. 32: Exogenes Glutamat erhöht die IFN- γ -Produktion in WT CD8⁺ T-Zellen.

Naive TZR transgene OT-I PDCD4^{+/+} (WT) oder OT-I PDCD4^{-/-} wurden durch OVA-I-Peptid beladene, an Mikrosphären gekoppelte chimäre MHC-I- und B7-Proteine sowie agonistischen Antikörpern gegen CTLA-4 aktiviert. Am Tag 2 wurden die Zellen mit Glutamat versetzt und am Tag 5 mittels Durchflusszytometrie auf deren IFN- γ -Produktion untersucht. Zahlen geben die jeweiligen prozentualen Anteile an positiven Zellen an. Die Daten sind repräsentativ für n=4 unabhängige Experimente. Datenpunkte (rechts) repräsentieren biologische Replikate mit Mittelwert und Standardabweichung, ns – nicht signifikant; *p<0,05; nach Berechnung durch Mann-Whitney Test.

Zusammenfassend konnte durch diese Daten gezeigt werden, dass durch den CTLA-4-vermittelten Mechanismus der verstärkten PDCD4 Expression in CD8⁺ T-Zellen die Translation der mRNA von spezifischen Genen gehemmt und dadurch kritische Effektorfunktionen wie die IFN- γ -Produktion reguliert wird.

4 Diskussion

4.1 CTLA-4-vermittelte Mechanismen wirken auf regulatorische Faktoren der CD8⁺ T-Zelldifferenzierung

Der Oberflächenrezeptor CTLA-4 wurde als essentieller Inhibitor der adaptiven Immunantwort identifiziert. Die Wirkung von CTLA-4 betrifft sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen und hat u.a. eine kritische Funktion bei der Regulation von anti-tumoralen Immunantworten. Trotz des therapeutischen Effekts einer Blockade von CTLA-4 bei Krebserkrankungen sind die CTLA-4-vermittelten Zell-intrinsischen Signale zur Inhibition von CD8⁺ T-Zellen, als wichtige Effektoren zur Beseitigung von Tumorzellen, weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollten daher CTLA-4-induzierte Mechanismen bei der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen identifiziert bzw. charakterisiert werden. Dazu wurde ein Aktivierungssystem angewandt, welches starke CTLA-4-abhängige Effekte ermöglicht ([Krummel und Allison, 1995](#)). Die Wirkung der Antikörper-vermittelten CTLA-4 Aktivierung war dabei abweichend von anderen Studien im humanen System, bei welchen inhibitorische Effekte bereits nach 4 Stunden aufgetreten waren ([Blair et al., 1998](#); [Riley et al., 2002](#)). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten System kann zudem von einer gleichstarken Stimulation bei CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ausgegangen werden, da weder ein Unterschied in der Proliferation noch in der CD44 Expression auftrat und auch bei jedem anderen analysierten Parameter an 24 h nach T-Zellaktivierung eine gleiche Ausprägung festgestellt werden konnte. Des Weiteren traten alle beobachteten Effekte des agonistischen anti-CTLA-4 Antikörpers zeitlich konform mit der Oberflächenexpression von CTLA-4 ab 48 h nach T-Zellaktivierung ein.

Die starke Reduktion der IFN- γ -Produktion in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen stimmt mit vorherigen Untersuchungen an CTLA-4-defizienten oder CTLA-4-blockierten CD8⁺ T-Zellen überein ([Hegel et al., 2009](#); [Pandiyana et al., 2007](#)). Das nach der Aktivierung gebildete IFN- γ entfaltet seine Wirkung auch auf CD8⁺ T-Zellen, wodurch CTLA-4 über die Kontrolle der IFN- γ Expression einen wichtigen Einfluss auf die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung ausüben kann ([Curtsinger et al., 2012](#); [Hosking et al., 2014](#)). Eine CTLA-4-abhängige Regulation von übergeordneten Zytokinrezeptoren konnte ausgeschlossen werden. Übereinstimmend mit der

Wirkung von IL-12 kam es zu einer starken Expression von T-bet, welche nicht von CTLA-4 Effekten betroffen war (Agarwal et al., 2009; Hegel et al., 2009). Der inhibitorische Effekt von CTLA-4 auf die Expression von Eomes wie 6 h nach sekundärer Aktivierung konnte nicht festgestellt werden, was an der fehlenden CTLA-4 Expression zu diesem Zeitpunkt nach primärer Aktivierung liegen kann (Agarwal et al., 2009; Hegel et al., 2009).

Ein wichtiger Bestandteil der T-Zelldifferenzierung ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, was u.a. durch IFN- γ -vermittelte Signale eingeschränkt werden kann (Prabhu et al., 2013; Stoycheva et al., 2015; Zhang und Starnbach, 2015). Neben der CTLA-4-abhängigen Regulation der IFN- γ -Produktion deutet auch die CTLA-4-vermittelte Induktion des Transkriptionsfaktors TCF-1 auf eine Rolle von CTLA-4 in der CD8⁺ T-Gedächtniszelldifferenzierung hin. TCF-1 unterdrückt dabei die Ausbildung von Effektorzellen und fördert die Differenzierung sowie das Überleben von zu Gedächtniszellen (Tiemessen et al., 2014; Zhou et al., 2010). Einen gleichen Zusammenhang liefert ebenso die aufgedeckte CTLA-4-vermittelte Regulation des TCF-1-induzierenden Transkriptionsfaktors FoxO1 (Tejera et al., 2013). Übereinstimmend konnte eine Reduktion von FoxO1 und TCF-1 nach einer selektiver CTLA-4 Deletion in CD4⁺ T-Zellen in einem EAE-Modell festgestellt werden (Paterson et al., 2015). Die in einer anderen Studie beschriebene FoxO1-vermittelte Repression von T-bet fand jedoch nicht statt, was an der Verwendung von WT CD8⁺ T-Zellen anstelle von FoxO1 k.o. CD8⁺ T-Zellen liegen kann. Da durch die T-Zellaktivierung die Wirkung von FoxO1 lediglich abgeschwächt und nicht vollständig abgeschaltet wird liegt in den Kontrollzellen ebenso eine geringe FoxO1 Aktivität vor, was die Auswirkung auf T-bet einschränken würde (Hedrick et al., 2012; Rao et al., 2012).

Inwiefern sich CTLA-4 Signale auf die Entwicklung von Gedächtniszellen auswirken, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass eine Blockade von CTLA-4 die Qualität von CD4⁺ T-Gedächtniszellen beeinflusst (Rudolph et al., 2011). Als qualitatives Merkmal konnte in dieser Arbeit eine verstärkte Reexpression von CD62L in CTLA-4-aktivierten CD8⁺ T-Zellen verzeichnet werden, wonach CTLA-4-vermittelte Signale die Ausbildung von zentralen Gedächtniszellen fördern würden (Sallusto et al., 1999). Eine

übereinstimmende Wirkung würde sich aus der CTLA-4-abhängigen Reaktivierung von FoxO1 ergeben (Fabre et al., 2008; Kim et al., 2013). Ein entsprechendes Resultat trat bei einer Studie mit CTLA-4-blockierenden Antikörpern ein, bei welcher die Blockade von CTLA-4 zu einer geringeren Ausbildung von CD62L⁺ CD8⁺ T-Gedächtniszellen führte (Pedicord et al., 2011).

In CD8⁺ T-Zellen fand die CTLA-4-vermittelte Regulation von FoxO1 unabhängig von Akt statt. Dies deutet auf eine zentrale Rolle von FoxO1 als Zielprotein von mehreren Signaltransduktionswegen hin. Akt war zum Zeitpunkt des CTLA-4 Effekts weder an der PDK1-abhängigen Threonin 308 noch an der mTOR-abhängigen Serin 473 Position phosphoryliert und lag somit in einem inaktiven Zustand vor (Hedrick et al., 2012; Stokoe et al., 1997). Dass sich Akt bereits 48 h nach T-Zellaktivierung wieder in einem inaktiven Zustand befindet, kann durch besonderen Ablauf der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen begründet sein. Je nach Aktivierungsstärke benötigen diese nur eine kurze Aktivierungsperiode von 2 bis 24 Stunden, um sich danach unabhängig von weiteren aktivierenden Signalen zu teilen und zu differenzieren (Kaech und Ahmed, 2001; van Stipdonk et al., 2001). Dadurch ergibt sich keine Notwendigkeit für länger anhaltende aktivierende Signale, was die Hypothese unterstützt, nach welcher CTLA-4 vielmehr eigene aktive Mechanismen induziert, anstatt die bloße Unterbindung von positiven Signalen zu bewirken.

Der festgestellte Rottlerin-Effekt auf die CTLA-4-vermittelte FoxO1 Relokalisation lässt bei der verwendeten Konzentration auf eine Beteiligung von PKC- δ oder PKC- θ schließen (Gschwendt et al., 1994; Springael et al., 2007). Von den beiden Kinasen kommt PKC- θ in Frage, denn nur diese Isoform ist in der Immunologischen Synapse vorhanden, wodurch eine Kolokalisation und somit eine Signaltransduktion mit CTLA-4 stattfinden kann (Egen und Allison, 2002; Monks et al., 1997). Die Wirkung von PKC- θ auf FoxO1 in CD8⁺ T-Zellen verläuft dabei entgegengesetzt zu der in regulatorischen T-Zellen. Dies stimmt mit den bereits beschriebenen unterschiedlichen Effekten von PKC- θ in Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen überein (Zanin-Zhorov et al., 2010). Obwohl der genaue Mechanismus noch unbekannt ist, könnte in CD8⁺ T-Zellen eine Interaktion zwischen CTLA-4 und PKC- θ , ähnlich zu der von CTLA-4 und PKC- η in regulatorischen T-Zellen stattfinden (Kong et al., 2014). Des Weiteren könnte FoxO1 indirekt über zellspezifische

Adaptormoleküle gesteuert sein. Eine Möglichkeit hierfür wäre eine Regulation durch SLY1, welches ebenfalls als CTLA-4 Zielprotein in der massenspektrometrischen Analyse detektiert wurde ([Schäll et al., 2015](#)).

4.2 CTLA-4 Signale führen zu definierten Änderungen bei der Proteinphosphorylierung in CD8⁺ T-Zellen

Die massenspektrometrische Analyse des Phosphoproteoms von CTL liefert bisher noch unbekannte Daten zu CTLA-4-abhängigen Änderungen von Proteinen und bildet eine Grundlage für die Identifikation neuer Mechanismen in der Regulation von CD8⁺ T-Zellen durch CTLA-4. In diesem Zusammenhang konnte z.B. die CTLA-4-vermittelte Dephosphorylierung des AP-1 Transkriptionsfaktors Fra-2 bzw. Induktion des Translationsinhibitors PDCD4 näher untersucht werden. Des Weiteren konnte durch die funktionelle Anreicherung der von CTLA-4 betroffenen Proteine nicht nur eine zu erwartende Kontrolle von T-Zell-spezifischen Prozessen, sondern auch eine bisher noch unbeschriebene Verknüpfung zwischen CTLA-4 und dem Vorgang der RNA-Prozessierung aufgedeckt werden. Letzteres beinhaltet z.B. die Regulation von Spleißfaktoren wie SFRS7 durch CTLA-4, wodurch Änderungen in der Genexpression auf post-transkriptioneller Stufe hervorgerufen werden können. Die Anreicherung verschiedener funktioneller Komplexe deutet an, dass CTLA-4 einen Einfluss auf CD8⁺ T-Zellen durch mehr als nur einen Mechanismus ausübt.

Die Untersuchung möglicher Proteininteraktionen zeigte, dass eine erhöhte Anzahl an CTLA-4-regulierten Proteinen mit dem Faktor FoxP3 assoziieren können ([Rudra et al., 2012](#)). CTLA-4 ist u.a. für die Funktion von FoxP3⁺ T-Zellen erforderlich und die erlangten Ergebnisse könnten somit auch Hinweise für weitere T-Zellsubpopulationen geben ([Wing et al., 2008](#)). In diesem Zusammenhang steht auch die Verbindung von CTLA-4 und PKC- η in regulatorischen T-Zellen und die in dieser Arbeit aufgedeckte CTLA-4-abhängige Phosphorylierung von PKC- η an Serin 675. In regulatorischen T-Zellen wurde gezeigt, dass PKC- η an CTLA-4 bindet und diese Interaktion für deren suppressorische Funktion erforderlich ist ([Kong et al., 2014](#)). Die identifizierte Phosphorylierungsstelle befindet sich außerhalb der CTLA-4 Bindungsregion. Wahrscheinlich erfolgt die Phosphorylierung als Folge der Assoziation von PKC- η an CTLA-4. Des Weiteren kann daraus geschlossen werden,

werden, dass der CTLA-4 / PKC- η Signalweg nicht nur in regulatorischen, sondern auch in CD8⁺ Zellen vorkommt. Möglicherweise handelt es sich um einen Mechanismus, welcher auch andere PKC-Isoformen wie z.B. PKC- θ betreffen kann.

Einen kritischen Einfluss auf die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung könnte CTLA-4 über die posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors Fra-2 ausüben. Fra-2 gehört zur Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren und wurde zum Einen bereits als wichtiger Faktor der T-Helferzelldifferenzierung beschrieben (Ciofani et al., 2012). Zum Anderen konnte in chronisch aktivierten und funktionell eingeschränkten („exhausted“) CD8⁺ T-Zellen eine verminderte Expression Fra-2 Gens *Fos/2* nachgewiesen werden (Tinoco et al., 2016). Obwohl die Konzentration der *Fos/2* mRNA nicht von CTLA-4 betroffen war, kann die CTLA-4-vermittelte Dephosphorylierung von Fra-2 ebenso zu einer reduzierten Proteinkonzentration durch Verringerung der Proteinstabilität führen (Alli et al., 2013). Dadurch ergibt sich ein gleichwirkender Mechanismus, mit welchem CTLA-4 die Aktivität von Fra-2 und somit die Funktion von chronisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen regulieren kann. Des Weiteren konnte eine Beteiligung von PKA bei der Phosphorylierung von Fra-2 in CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. An welcher Stelle CTLA-4 in den PKA-Signalweg eingreift, kann jedoch anhand vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig bestimmt werden. Eine CTLA-4-vermittelte Regulation des G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptors A_{2A}R wäre denkbar. Die CTLA-4-abhängige Abschwächung von PKA-Signalen würde sich demnach wiederum positiv auf die Ausbildung von CD8⁺ T-Gedächtniszellen auswirken (Cekic et al., 2013).

4.3 Das CTLA-4 Zielprotein PDCD4 spielt eine wichtige Rolle bei anti-tumoralen Immunantworten

Durch die massenspektrometrische Analyse konnte die CTLA-4-vermittelte Induktion des Translationsinhibitors PDCD4 aufgedeckt werden (Yang et al., 2003). Dieser Mechanismus bietet für den zeitlich verzögert exprimierten CTLA-4 Rezeptor ein effektives Mittel, um bereits aktivierte CD8⁺ T-Zellen mit hoher transkriptionaler Aktivität zu regulieren. Des Weiteren ermöglicht die verzögerte Expression von PDCD4 eine anhaltende Wirkung auf CTL, welche auch bei Immunreaktionen

gegenüber Zielzellen bestehen bliebe. Dadurch könnten sich sekundäre Effekte von CTLA-4 auf CD8⁺ T-Zellantworten ergeben ([Chambers et al., 1998](#)).

In CD8⁺ T-Zellen erfolgt die CTLA-4-vermittelte Induktion von PDCD4 durch eine Erhöhung der Genexpression. Diese Form der Regulation ist gegensätzlich zur der in B-Zellen, bei welcher die PDCD4 Konzentration primär durch proteasomale Degradation gesteuert wird ([Steinhardt et al., 2014](#)). Die Degradations-unabhängige Regulation von PDCD4 in CD8⁺ T-Zellen steht nicht in Konflikt mit der CTLA-4-vermittelten Aktivierung von Ubiquitinligasen, welche entgegengesetzt zu einer Verringerung der PDCD4 Menge führen würde ([Hoff et al., 2010](#)). Ebenso kann eine entzündungsabhängige Reduktion von PDCD4 durch micro-RNA 21 ausgeschlossen werden ([Davis et al., 2008](#); [Sheedy et al., 2010](#)). Des Weiteren ist PDCD4 ausschließlich im Zytoplasma von CD8⁺ T-Zellen vorhanden. Daher bewirkt eine Serin-457 Phosphorylierung keine nukleäre Translokation von PDCD4, wie es bereits für HEK293 Zellen beschrieben wurde ([Palamarchuk et al., 2005](#)). Die zytoplasmatische Verteilung von PDCD4 steht dabei in Einklang mit dessen Funktion als Inhibitor der dort stattfindenden Proteintranslation. Die Kontrolle von PDCD4 erfolgt somit in einer zelltypspezifischen Art und Weise. Eine PDCD4-Defizienz führt in Mäusen nach 80 Wochen zur Manifestierung von B-Zell-Lymphomen, was für eine Funktion von PDCD4 in der Erhaltung des Ruhezustands von B-Zellen spricht ([Hilliard et al., 2006](#); [Steinhardt et al., 2014](#)). Im Unterschied dazu kommt die Rolle von PDCD4 als Translationsinhibitor vorrangig in aktivierten CD8⁺ T-Zellen zum Tragen. Es liegt ebenso keine proinflammatorische Wirkung von PDCD4 in CD8⁺ T-Zellen vor. Somit ist nicht nur die Regulation von PDCD4, sondern auch dessen Funktion zelltypspezifisch.

Diese unterschiedlichen Bedeutungen von PDCD4 spiegeln sich auch in der Tumorbilogie wider. Obwohl PDCD4 ursprünglich als Tumorsuppressor entdeckt wurde, ist dessen Wirkung vom jeweiligen Kontext abhängig ([Fay et al., 2014](#)). Bei den durchgeführten experimentellen Tiermodellen konnte die Abwesenheit von PDCD4 einen eindeutigen anti-tumoralen Effekt auslösen. Dies entspricht der Wirkung einer CTLA-4-Blockade während einer Immun-Checkpoint Therapie und unterstreicht die Funktion von PDCD4 als CTLA-4-induzierter Inhibitor von Tumorzell-eliminierenden CTL ([Hadrup et al., 2013](#); [Kilinc et al., 2009](#); [Leach et al., 1996](#)). In

der vorliegenden Arbeit wurde der anti-tumorale Effekt sowohl für eine generelle PDCD4 Defizienz als auch Zelltyp-spezifisch für transferierte CD8⁺ T-Lymphozyten gezeigt. Die verstärkte anti-tumorale Aktivität von PDCD4-defizienten CTL kann durch die erhöhte Produktion von protektiven IFN- γ begründet werden ([Ikeda et al., 2002](#); [Shankaran et al., 2001](#)). In diesem Zusammenhang spielt auch das identifizierte PDCD4-Ziel Glutaminase eine entscheidende Rolle. Die von PDCD4 regulierte Isoform der Glutaminase wurde als begrenzendes Enzym der Glutaminolyse charakterisiert und ist in CD8⁺ T-Zellen nicht durch Genexpression reguliert. Der gesteigerte metabolische Bedarf von CD8⁺ T-Effektorzellen wird vor allem durch die Glutaminolyse gedeckt. Die PDCD4-vermittelte translationale Inhibition der Glutaminaseexpression führt demnach zu einer Einschränkung des Zellmetabolismus und somit zu eingeschränkten CTL Immunantworten ([Carr et al., 2010](#); [Gao et al., 2009](#); [Siska und Rathmell, 2015](#); [Wang et al., 2011](#)).

Im durchgeführten B16-OVA Tumorexperiment zeigte der adoptive Transfer von WT CD8⁺ T-Zellen keine Wirkung auf des Tumorstadium. Diese Ineffektivität von naiven CD8⁺ T-Zellen wurde auch in einem anderen Modell mit B16-Melanomzellen beobachtet ([Overwijk et al., 2003](#)). Eine signifikante Verringerung des B16-OVA Tumorstadiums ergab sich nur durch eine Behandlung mit PDCD4-defizienten CD8⁺ T-Zellen und nicht durch den Transfer von CTLA-4 k.o. Zellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine PDCD4 Aktivierung durch weitere Mechanismen erfolgen kann und nicht allein durch CTLA-4 Signale vermittelt wird. Eine Möglichkeit besteht z.B. in der Regulation von PDCD4 durch den inhibitorischen Rezeptor PD-1. In T-Helferzellen wurde bereits eine PD-1-abhängige suppressive Wirkung von PDCD4 nachgewiesen ([Iliopoulos et al., 2011](#)). Des Weiteren bewirkt PD-1 in chronisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen, welche bei persistierenden Infektionen und Tumorerkrankungen vorliegen, durch Erhöhung der FoxO1 Aktivität eine Aufrechterhaltung des Differenzierungsstatus' der „Exhaustion“ ([Staron et al., 2014](#)). Über FoxO1 kann PD-1 somit eine CTLA-4-unabhängige PDCD4 Induktion vermitteln. Eine erhöhte PDCD4 mRNA Menge wurde bereits in chronisch aktivierten und funktionell eingeschränkten CD8⁺ T-Zellen detektiert ([Doering et al., 2012](#)). Folglich könnte PDCD4 durch einen redundanten Mechanismus in CTL induziert werden, welche zu einem Zeitpunkt jeweils kein CTLA-4 oder PD-1 exprimieren oder deren Signale einzeln durch therapeutische Antikörper blockiert werden. Des Weiteren

wurde gezeigt, dass eine Blockade von CTLA-4 zur Verstärkung des PD-1/PD-L1 Signalwegs führen kann, was eine erhöhte PDCD4-Expression in CTL zur Folge hätte (Shi et al., 2016). Demnach würde eine PDCD4-Blockade genauso wie die anti-CTLA-4 / anti-PD-1 Kombinationstherapie eine erhöhte Effizienz in anti-tumoralen Immunantworten bewirken (Curran et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PDCD4 ein potentielles Ziel für eine Krebstherapie darstellt, da sich ein systemischer Verlust von PDCD4 ebenfalls positiv auf die Tumorabstoßung auswirkte. Der Effekt von PDCD4 bei der Aufrechterhaltung des Ruhezustands von B-Zellen ist bei einer kurzzeitigen Therapie wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung, da PDCD4 ko Mäuse erst im hohen Alter von 80 Wochen zur Entwicklung von B-Zell-Lymphome tendieren (Hilliard et al., 2006). Die Bedeutung von PDCD4 in weiteren, bei der anti-tumoralen Immunantwort beteiligten Zellen wurde bisher jedoch noch nicht genau untersucht. In FoxP3⁺ T-Zellen könnte die Inaktivierung von PDCD4 deren regulatorische Wirkung beeinträchtigen. In diesen Zellen ist PDCD4 ein Teil des FoxO1-abhängigen Expressionsprofils, welches für die regulatorische Funktion essentiell ist (Ouyang et al., 2012). Da regulatorische T-Zellen die anti-tumorale Immunantwort inhibieren, würde eine Blockade von PDCD4 in diesen Zellen ebenfalls die anti-tumorale Therapie verbessern, vergleichbar mit dem synergistischen Effekt der Kombination aus CTLA-4 Blockade und anti-CD25 Antikörper-vermittelten Depletion (Sutmuller et al., 2001). Des Weiteren könnte die Inhibition von PDCD4 eine anti-inflammatorische Wirkung erzielen und dadurch die anti-tumorale Immunantwort beeinflussen (Sheedy et al., 2010). Der Einfluss von inflammatorischen Ereignissen auf die Tumorprogression ist jedoch gegensätzlich und abhängig vom Stadium des Tumors. Während zu frühen Zeitpunkten pro-inflammatorische Effekte eine anti-tumorale Immunantwort auslösen können, haben Entzündungsreaktionen bei etablierten Tumoren eine starke pro-tumorale Wirkung (Grivennikov et al., 2010). Da eine PDCD4-basierte Therapie erst nach der Feststellung bzw. Manifestierung einer Krebserkrankung durchgeführt werden würde, ist unter diesen Gesichtspunkten eine anti-tumorale Wirkung der Entzündungshemmung durch PDCD4 Inaktivierung wahrscheinlich.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten liefern neue Erkenntnisse zu CTLA-4-vermittelten Mechanismen in CD8⁺ T-Zellen. Anhand der Analyse von phosphorylierten Proteinen in CTLA-4-aktivierten CTL konnte nachgewiesen werden, dass CTLA-4 auf Signalwege zurückgreift, welche die Regulation von post-transkriptionalen und -translationalen Prozessen beinhalten. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Differenzierung der schnell aktivierbaren CD8⁺ T-Zellen entscheidend zu beeinflussen. Unter den aufgedeckten Mechanismen konnte dem CTLA-4-induzierten Translationsinhibitor PDCD4 eine kritische Rolle bei der anti-tumoralen Immunantwort von CD8⁺ T-Zellen beigemessen werden. Die erhobenen Daten zeigen weiterhin, dass die PDCD4 Expression durch den Transkriptionsfaktor FoxO1 vermittelt wird. Die Regulation dieses zentralen Faktors erfolgt in Abhängigkeit von multiplen Signalwegen, wodurch PDCD4 auch durch andere inhibitorisch wirkende Rezeptoren, wie z.B. PD-1, in CD8⁺ T-Zellen induziert werden kann. Des Weiteren könnte PDCD4 auch in konventionellen CD4⁺ T-Zellen durch CTLA-4 bzw. PD-1 reguliert werden und für die Funktion von regulatorischen T-Zellen notwendig sein. Falls sich dieser Zusammenhang in zukünftigen Experimenten bestätigt, würde PDCD4 ein bisher unbekannter intrazellulärer Immun-Checkpoint darstellen. Für diesen würden sich abweichend von der bisherigen Antikörper-vermittelten Blockade von Oberflächenrezeptoren neue Therapiemöglichkeiten ergeben, indem z.B. ein zellpermeabler Wirkstoff die Funktion von PDCD4 unterbindet. Dadurch könnte eine höhere Effektivität und eine Verringerung der Nebenwirkungen erreicht werden, was zu einer Verbesserung des vielsprechenden Ansatzes der anti-tumoralen Immuntherapie führen würde.

Der Oberflächenrezeptor Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4 (CTLA-4) ist einer der hauptverantwortlichen negativen Regulatoren der adaptiven Immunantwort. CTLA-4 übt eine kritische Rolle bei der CD8⁺ T-Zelldifferenzierung aus, indem es die Produktion von Effektormolekülen, wie IFN- γ , von Zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) inhibiert und den funktionell eingeschränkten Zustand von chronisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen aufrechterhält. Die Blockade von CTLA-4 durch Antikörper stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Wiederherstellung von effektiven CTL-Antworten dar, der bereits in der anti-tumoralen Immun-Checkpoint-Therapie zur Behandlung von fortgeschrittenen malignen Melanomen zum Einsatz kommt. Die CTLA-4-vermittelten Mechanismen sowie die zugrundeliegende Signaltransduktion bei der CD8⁺ T-Zelldifferenzierung sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein *in vitro* T-Zellaktivierungssystem in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse der phosphorylierten CD8⁺ T-Zellproteine eingesetzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von CTLA-4 in CD8⁺ T-Zellen definierte post-translationale Modifikationen hervorruft, die eine Regulation der Zelldifferenzierung ermöglichen. Durch die massenspektrometrische Analyse konnten CTLA-4-induzierte Änderungen in der Phosphorylierung von Proteinen aufgedeckt werden, welche in den zellbiologischen Vorgängen der T-Zellaktivierung, DNA-Replikation, RNA-Prozessierung und Mikrotubuli-Polymerisation involviert sind. Neben anderen wichtigen Zielproteinen konnte die CTLA-4-vermittelte Regulation des Translationsinhibitors PDCD4 aufgedeckt und näher charakterisiert werden. Durch die Induktion von PDCD4 kann CTLA-4 die Effektorfunktion, wie z.B. die Produktion des Zytokins IFN- γ , von CTL einschränken. Entsprechend führte eine PDCD4-Defizienz zu einer Verringerung des Tumorwachstum in Experimenten mit transplantierten Melanom- und Prostatakarzinomzellen *in vivo*. Zusammengefasst zeigen diese Daten bisher noch unbekannte CTLA-4-vermittelte Mechanismen und Signalwege insbesondere zur Restriktion der Proteintranslation, welche zu eingeschränkten Immunantworten von CTL führen und potenzielle Ziele zur Verbesserung der anti-tumoralen Immuntherapie darstellen.

Abstract

The surface receptor Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4 (CTLA-4) is a main attenuator of adaptive immune responses. CTLA-4 plays a critical role in CD8⁺ T-cell differentiation by inhibiting the IFN- γ production of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and by promoting the functionally impaired state of CD8⁺ T-cell exhaustion. The blockade of CTLA-4 is already being used in anti-tumoral immune-checkpoint therapy as a promising approach to restore effective CTL responses in cancer disease. However, the underlying CTLA-4-mediated mechanisms and signal transduction pathways in CTLs still remain elusive. To address this question an *in vitro* T-cell activation combined with mass spectrometry analysis of phosphorylated CD8⁺ T-cell proteins was performed.

The data revealed that CTLA-4 engagement led to defined post-translational modifications in CD8⁺ T cells providing an effective mechanism to regulate cell differentiation. The activation of CTLA-4 led to changes in the phosphorylation of proteins involved in T-cell signaling, DNA replication, RNA processing and microtubule polymerization. Beside other targets, a CTLA-4-mediated regulation of the translational inhibitor PDCD4 was discovered and characterized. The induction of PDCD4 by CTLA-4 restricted the effector functions of CTLs like the production of IFN- γ . Accordingly, the deficiency of PDCD4 led to superior control of *in vivo* tumor growth of melanoma and prostate cancer cells. These findings reveal novel CTLA-4-mediated pathways and mechanisms including the restriction of protein translation that lead to attenuated CD8⁺ T-cell responses thereby suggesting novel targets and strategies to improve anti-tumor immunotherapy.

6 Literaturverzeichnis

- Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Horikawa, N., Murakami, R., Yamaguchi, K., Yoshioka, Y., Baba, T., Konishi, I. und Mandai, M. (2015). IFN-gamma from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br. J. Cancer* *112*, 1501–1509.
- Agarwal, P., Raghavan, A., Nandiwada, S.L., Curtsinger, J.M., Bohjanen, P.R., Mueller, D.L. und Mescher, M.F. (2009). Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J. Immunol.* *183*, 1695–1704.
- Alli, N.S., Yang, E.C., Miyake, T., Aziz, A., Collins-Hooper, H., Patel, K. und McDermott, J.C. (2013). Signal-dependent fra-2 regulation in skeletal muscle reserve and satellite cells. *Cell Death Dis.* *4*, e692.
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Vaquerizas, J.M., Conde, L. und Dopazo, J. (2005). BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res.* *33*, W460–W464.
- Anders, S. und Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* *11*, R106.
- Araujo-Souza, P.S. de, Hanschke, S.C. und Viola, J.P. (2015). Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells. *J. Immunol. Res.* *2015*, 849573.
- Bachmann, M.F., Kohler, G., Ecabert, B., Mak, T.W. und Kopf, M. (1999). Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J. Immunol.* *163*, 1128–1131.
- Baumeister, S.H., Freeman, G.J., Dranoff, G. und Sharpe, A.H. (2016). Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 539–573.
- Best, J.A., Blair, D.A., Knell, J., Yang, E., Mayya, V., Doedens, A., Dustin, M.L. und Goldrath, A.W. (2013). Transcriptional insights into the CD8(+) T cell response to infection and memory T cell formation. *Nat. Immunol.* *14*, 404–412.
- Beyersdorf, N., Kerkau, T. und Hunig, T. (2015). CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther.* *4*, 111–122.
- Biggs, W.3., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K. und Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 7421–7426.
- Biyanee, A., Ohnheiser, J., Singh, P. und Klempnauer, K.H. (2015). A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pdc4: inhibition of translation elongation. *Oncogene* *34*, 1384–1392.
- Blair, P.J., Riley, J.L., Levine, B.L., Lee, K.P., Craighead, N., Francomano, T., Perfetto, S.J., Gray, G.S., Carreno, B.M. und June, C.H. (1998). CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J. Immunol.* *160*, 12–15.
- Boomer, J.S. und Green, J.M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a002436.

- Boyman, O. und Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 180–190.
- Bronevetsky, Y. und Ansel, K.M. (2013). Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. *Immunol. Rev.* 253, 304–316.
- Brownlie, R.J. und Zamoyska, R. (2013). T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 257–269.
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I. und Kagan, J.C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290.
- Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G. und Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328, 267–270.
- Brunner, M.C., Chambers, C.A., Chan, F.K., Hanke, J., Winoto, A. und Allison, J.P. (1999). CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 162, 5813–5820.
- Carr, E.L., Kelman, A., Wu, G.S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Am Turay und Frauwirth, K.A. (2010). Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J. Immunol.* 185, 1037–1044.
- Carreno, B.M., Bennett, F., Chau, T.A., Ling, V., Luxenberg, D., Jussif, J., Baroja, M.L. und Madrenas, J. (2000). CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol.* 165, 1352–1356.
- Cekic, C., Sag, D., Day, Y.J. und Linden, J. (2013). Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance. *J. Exp. Med.* 210, 2693–2706.
- Chambers, C.A., Sullivan, T.J. und Allison, J.P. (1997). Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* 7, 885–895.
- Chambers, C.A., Sullivan, T.J., Truong, T. und Allison, J.P. (1998). Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 3137–3143.
- Chan, D.V., Gibson, H.M., Aufiero, B.M., Wilson, A.J., Hafner, M.S., Mi, Q.S. und Wong, H.K. (2014). Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun.* 15, 25–32.
- Chen, L. und Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 227–242.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., et al. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151, 289–303.
- Cohen, N.R., Brennan, P.J., Shay, T., Watts, G.F., Brigl, M., Kang, J. und Brenner, M.B. (2013). Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells. *Nat. Immunol.* 14, 90–99.

- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., DiStuart, van der Merwe, P.A. und Davis, S.J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201–210.
- Cronin, S.J. und Penninger, J.M. (2007). From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity. *Immunol. Rev.* 220, 151–168.
- Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H. und Allison, J.P. (2010). 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. USA* 107, 4275–4280.
- Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Lins, D.C. und Mescher, M.F. (2012). Autocrine IFN-gamma promotes naive CD8 T Cell differentiation and synergizes with IFN-alpha to stimulate strong function. *J. Immunol.* 189, 659–668.
- Curtsinger, J.M. und Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 333–340.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G. und Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56–61.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. und Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Doering, T.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Paley, M.A., Ziegler, C.G. und Wherry, E.J. (2012). Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell Exhaustion versus memory. *Immunity* 37, 1130–1144.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E. und Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314, 467–471.
- Egen, J.G. und Allison, J.P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16, 23–35.
- Fabre, S., Carrette, F., Chen, J., Lang, V., Semichon, M., Denoyelle, C., Lazar, V., Cagnard, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Mangeney, M., et al. (2008). FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T Cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* 181, 2980–2989.
- Fay, M.M., Clegg, J.M., Uchida, K.A., Powers, M.A. und Ullman, K.S. (2014). Enhanced arginine methylation of programmed cell death 4 protein during nutrient deprivation promotes tumor cell viability. *J. Biol. Chem.* 289, 17541–17552.
- Fehler, O., Singh, P., Haas, A., Ulrich, D., Muller, J.P., Ohnheiser, J. und Klempnauer, K.-H. (2014). An evolutionarily conserved interaction of tumor suppressor protein Pcd4 with the poly(A)-binding protein contributes to translation suppression by Pcd4. *Nucleic Acids Res.* 42, 11107–11118.
- Finn, P.W., He, H., Wang, Y., Wang, Z., Guan, G., Listman, J. und Perkins, D.L. (1997). Synergistic induction of CTLA-4 expression by costimulation with TCR plus CD28 signals mediated by increased transcription and messenger ribonucleic acid stability. *J. Immunol.* 158, 4074–4081.

- Fuertes Marraco, S.A., Neubert, N.J., Verdeil, G. und Speiser, D.E. (2015). Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* 6, 310.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., de Am Marzo, van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762–765.
- Gérard, A., Khan, O., Beemiller, P., Oswald, E., Hu, J., Matloubian, M. und Krummel, M.F. (2013). Secondary T cell–T cell synaptic interactions drive the differentiation of protective CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 14, 356–363.
- Gibson, H.M., Hedgcock, C.J., Aufiero, B.M., Wilson, A.J., Hafner, M.S., Tsokos, G.C. und Wong, H.K. (2007). Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J. Immunol.* 179, 3831–3840.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. und Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 1097–1101.
- Gruda, M.C., Kovary, K., Metz, R. und Bravo, R. (1994). Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene* 9, 2537–2547.
- Gschwendt, M., Muller, H.J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G. und Marks, F. (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 93–98.
- Hadrup, S., Donia, M. und Thor, S.P. (2013). Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 6, 123–133.
- Hansen, J.A., Martin, P.J. und Nowinski, R.C. (1980). Monoclonal antibodies identifying a novel T-cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes. *Immunogenetics* 10, 247–260.
- Haring, J.S., Badovinac, V.P. und Harty, J.T. (2006). Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity* 25, 19–29.
- Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattei, M.G., Luciani, M.F. und Golstein, P. (1991). CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J. Immunol.* 147, 1037–1044.
- Hedrick, S.M., Hess, M.R., Doedens, A.L., Goldrath, A.W. und Stone, E.L. (2012). FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 649–661.
- Hegel, J.K., Knieke, K., Kolar, P., Reiner, S.L. und Brunner-Weinzierl, M.C. (2009). CD152 (CTLA-4) regulates effector functions of CD8+ T lymphocytes by repressing Eomesodermin. *Eur. J. Immunol.* 39, 883–893.
- Hess Michelini, R., Doedens, A.L., Goldrath, A.W. und Hedrick, S.M. (2013). Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *J. Exp. Med.* 210, 1189–1200.

- Hilliard, A., Hilliard, B., Zheng, S.J., Sun, H., Miwa, T., Song, W., Goke, R. und Chen, Y.H. (2006). Translational regulation of autoimmune inflammation and lymphoma genesis by programmed cell death 4. *J. Immunol.* *177*, 8095–8102.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711–723.
- Hoff, H., Kolar, P., Ambach, A., Radbruch, A. und Brunner-Weinzierl, M.C. (2010). CTLA-4 (CD152) inhibits T cell function by activating the ubiquitin ligase Itch. *Mol. Immunol.* *47*, 1875–1881.
- Hosking, M.P., Flynn, C.T. und Whitton, J.L. (2014). Antigen-Specific naive CD8+ T cells produce a single pulse of IFN-gamma in vivo within hours of infection, but without antiviral effect. *J. Immunol.* *193*, 1873–1885.
- Hsieh, C.S., Lee, H.M. und Lio, C.W. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 157–167.
- Hurwitz, A.A., Yu, T.F., Leach und Allison, J.P. (1998). CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 10067–10071.
- Iida, T., Ohno, H., Nakaseko, C., Sakuma, M., Takeda-Ezaki, M., Arase, H., Kominami, E., Fujisawa, T. und Saito, T. (2000). Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J. Immunol.* *165*, 5062–5068.
- Ikeda, H., Old, L.J. und Schreiber, R.D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* *13*, 95–109.
- Iliopoulos, D., Kavousanaki, M., Ioannou, M., Boumpas, D. und Verginis, P. (2011). The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1754–1763.
- Kaech, S.M. und Ahmed, R. (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol.* *2*, 415–422.
- Kaech, S.M. und Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 749–761.
- Kearney, E.R., Walunas, T.L., Karr, R.W., Morton, P.A., Loh, D.Y., Bluestone, J.A. und Jenkins, M.K. (1995). Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J. Immunol.* *155*, 1032–1036.
- Khattari, R., Auger, J.A., Griffin, M.D., Sharpe, A.H. und Bluestone, J.A. (1999). Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J. Immunol.* *162*, 5784–5791.
- Kilinc, M.O., Gu, T., Harden, J.L., Virtuoso, L.P. und Egilmez, N.K. (2009). Central role of tumor-associated CD8+ T effector/memory cells in restoring systemic antitumor immunity. *J. Immunol.* *182*, 4217–4225.

- Kim, M.V., Ouyang, W., Liao, W., Zhang, M.Q. und Li, M.O. (2013). The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8⁺ T Cell responses to infection. *Immunity* 39, 286–297.
- Klages, K., Mayer, C.T., Lahl, K., Loddenkemper, C., Teng, M.W., Ngiow, S.F., Smyth, M.J., Hamann, A., Huehn, J. und Sparwasser, T. (2010). Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Res* 70, 7788–7799.
- Klawonn, F. (2012). Significance tests to identify regulated proteins based on a large number of small samples. *Kybernetika* 48, 478–493.
- Klocke, K., Sakaguchi, S., Holmdahl, R. und Wing, K. (2016). Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, E2383-92.
- Kong, K.F., Fu, G., Zhang, Y., Yokosuka, T., Casas, J., Canonigo-Balancio, A.J., Becart, S., Kim, G., Yates, 3., JR, Kronenberg, M., et al. (2014). Protein kinase C- ϵ controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function. *Nat. Immunol.* 15, 465–472.
- Kroczyńska, B., Sharma, B., Eklund, E.A., Fish, E.N. und Plataniás, L.C. (2012). Regulatory effects of programmed cell death 4 (PDCD4) protein in interferon (IFN)-stimulated gene expression and generation of type I IFN responses. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2809–2822.
- Krummel, M.F. und Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182, 459–465.
- Kuehn, H.S., Ouyang, W., Lo B, Deenick, E.K., Niemela, J.E., Avery, D.T., Schickel, J.N., Tran, D.Q., Stoddard, J., Zhang, Y., et al. (2014). Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 345, 1623–1627.
- Kwon, E.D., Hurwitz, A.A., Foster, B.A., Madias, C., Feldhaus, A.L., Greenberg, N.M., Burg, M.B. und Allison, J.P. (1997). Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8099–8103.
- Leach, Krummel, M.F. und Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734–1736.
- Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P.J., Lombard, D.B., Freeman, G.J., Nadler, L.M., Gray, G.S., et al. (1993). Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J. Immunol.* 151, 3489–3499.
- Linsley, P.S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K.L. und Mittler, R.S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4, 535–543.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K. und Ledbetter, J.A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174, 561–569.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C. und Damle, N.K. (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176, 1595–1604.

- Liu, W., Almo, S.C. und Zang, X. (2016). Co-stimulate or Co-inhibit Regulatory T Cells, Which Side to Go? *Immunol. Invest.* *45*, 813–831.
- Lopez, J.A., Brennan, A.J., Whisstock, J.C., Voskoboinik, I. und Trapani, J.A. (2012). Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol.* *33*, 406–412.
- Lu, L., Barbi, J. und Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.*
- Ma, J., Ding, Y., Fang, X., Wang, R. und Sun, Z. (2012). Protein kinase C-theta inhibits inducible regulatory T cell differentiation via an AKT-Foxo1/3a-dependent pathway. *J. Immunol.* *188*, 5337–5347.
- MacIver, N.J., Michalek, R.D. und Rathmell, J.C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 259–283.
- Martinez, G.J., Pereira, R.M., Aijo, T., Kim, E.Y., Marangoni, F., Pipkin, M.E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y.C., Crotty, S., et al. (2015). The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity* *42*, 265–278.
- Masteller, E.L., Chuang, E., Mullen, A.C., Reiner, S.L. und Thompson, C.B. (2000). Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J. Immunol.* *164*, 5319–5327.
- Mazandu, G.K. und Mulder, N.J. (2013). DaGO-Fun: Tool for Gene Ontology-based functional analysis using term information content measures. *BMC Bioinformatics* *14*, 284.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E. und Andrian, U.H. von. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* *427*, 154–159.
- Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F. und Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* *211*, 81–92.
- Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. und Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* *385*, 83–86.
- Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R. und Heath, W.R. (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 137–161.
- Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M.E., Kaminski, M., Gostick, E., Price, D.A., Freeman, G.J., Wherry, E.J., et al. (2009). Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* *5*, e1000313.
- Olson, C.M., Donovan, M.R., Spellberg, M.J. und Marr, M.T. (2013). The insulin receptor cellular IRES confers resistance to eIF4A inhibition. *Elife* *2*, e00542.
- Otipoby, K.L., Waisman, A., Derudder, E., Srinivasan, L., Franklin, A. und Rajewsky, K. (2015). The B-cell antigen receptor integrates adaptive and innate immune signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *112*, 12145–12150.
- Ouyang, W., Liao, W., Luo, C.T., Yin, N., Huse, M., Kim, M.V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., et al. (2012). Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control Treg cell function. *Nature* *491*, 554–559.

- Overwijk, W.W., Theoret, Finkelstein, S.E., Surman, de La Jong, Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., et al. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 198, 569–580.
- Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Aquilan, R.I., Croce, C.M. und Pekarsky, Y. (2005). Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 65, 11282–11286.
- Pandiyani, P., Hegel, J.K.E., Krueger, M., Quandt, D. und Brunner-Weinzierl, M.C. (2007). High IFN-gamma production of individual CD8 T Lymphocytes is controlled by CD152 (CTLA-4). *J. Immunol.* 178, 2132–2140.
- Paterson, A.M., Lovitch, S.B., Sage, P.T., Juneja, V.R., Lee, Y., Trombley, J.D., Arancibia-Carcamo, C.V., Sobel, R.A., Rudensky, A.Y., Kuchroo, V.K., et al. (2015). Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J. Exp. Med.* 212, 1603–1621.
- Patsoukis, N., Li, L., Sari, D., Petkova, V. und Boussiotis, V.A. (2013). PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 33, 3091–3098.
- Pedicord, V.A., Montalvo, W., Leiner, I.M. und Allison, J.P. (2011). Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8+ T-cell memory formation, function, and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 266–271.
- Peggs, K.S., Quezada, S.A., Chambers, C.A., Korman, A.J. und Allison, J.P. (2009). 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.* 206, 1717–1725.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. und Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4489–4494.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A. und Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv. Physiol. Educ.* 37, 273–283.
- Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K. und Allison, J.P. (2004). B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21, 401–413.
- Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., et al. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8372–8377.
- Piccirillo, C.A., Bjur, E., Topisirovic, I., Sonenberg, N. und Larsson, O. (2014). Translational control of immune responses: from transcripts to translomes. *Nat. Immunol.* 15, 503–511.
- Prabhu, N., Ho, A.W., Wong, K.H., Hutchinson, P.E., Chua, Y.L., Kandasamy, M., Lee, D.C., Sivasankar, B. und Kemeny, D.M. (2013). Gamma interferon regulates contraction of the influenza virus-specific CD8 T cell response and limits the size of the memory population. *J. Virol.* 87, 12510–12522.

- Qureshi, O.S., Kaur, S., Hou, T.Z., Le Jeffery, Poulter, N.S., Briggs, Z., Kenefeck, R., Willox, A.K., Royle, S.J., Rappoport, J.Z., et al. (2012). Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *J. Biol. Chem.* *287*, 9429–9440.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Le Jeffery, Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86- a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* *332*, 600–603.
- Rao, R.R., Li, Q., Gubbels, B. und Shrikant, P.A. (2012). Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* *36*, 374–387.
- Riley, J.L., Mao, M., Kobayashi, S., Biery, M., Burchard, J., Cavet, G., Gregson, B.P., June, C.H. und Linsley, P.S. (2002). Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 11790–11795.
- Romo-Tena, J., Gomez-Martin, D. und Alcocer-Varela, J. (2013). CTLA-4 and autoimmunity: new insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmun. Rev.* *12*, 1171–1176.
- Rudd, C.E. und Schneider, H. (2003). Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 544–556.
- Rudd, C.E., Taylor, A. und Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* *229*, 12–26.
- Rudolph, M., Hebel, K., Miyamura, Y., Maverakis, E. und Brunner-Weinzierl, M.C. (2011). Blockade of CTLA-4 decreases the generation of multifunctional memory CD4+ T cells in vivo. *J. Immunol.* *186*, 5580–5589.
- Rudra, D., deRoos, P., Chaudhry, A., Niec, R.E., Arvey, A., Samstein, R.M., Leslie, C., Shaffer, S.A., Goodlett und Rudensky, A.Y. (2012). Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat. Immunol.* *13*, 1010–1019.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. und Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708–712.
- Schäll, D., Schmitt, F., Reis, B., Brandt, S. und Beer-Hammer, S. (2015). SLY1 regulates T-cell proliferation during *Listeria monocytogenes* infection in a Foxo1-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* *45*, 3087–3097.
- Schietinger, A. und Greenberg, P.D. (2014). Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* *35*, 51–60.
- Schildberg, F.A., Klein, S.R., Freeman, G.J. und Sharpe, A.H. (2016). Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* *44*, 955–972.
- Schneider, H., Mandelbrot, D.A., Greenwald, R.J., Ng, F., Lechler, R., Sharpe, A.H. und Rudd, C.E. (2002). Cutting edge: CTLA-4 (CD152) differentially regulates mitogen-activated protein kinases (extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase) in CD4+ T cells from receptor/ligand-deficient mice. *J. Immunol.* *169*, 3475–3479.

- Schneider, H., Smith, X., Liu, H., Bismuth, G. und Rudd, C.E. (2008a). CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur. J. Immunol.* **38**, 40–47.
- Schneider, H., Valk, E., Leung, R. und Rudd, C.E. (2008b). CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *PloS one* **3**, e3842.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. und Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163–189.
- Schüler, T. und Blankenstein, T. (2003). Cutting edge: CD8+ effector T cells reject tumors by direct antigen recognition but indirect action on host cells. *J. Immunol.* **170**, 4427–4431.
- Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Quigley, M., Henning, K.A., Chen, T., Srinivasan, M. und Korman, A.J. (2013). Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 32–42.
- Shadforth, I.P., Dunkley, T.P., Lilley, K.S. und Bessant, C. (2005). i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ. *BMC Genomics* **6**, 145.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. und Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111.
- Shaulian, E. und Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**, E131-6.
- Sheedy, F.J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E.J., Martin, C., O'Leary, J.J., Ruan, Q., Johnson, D.S., Chen, Y. und La O'Neill. (2010). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* **11**, 141–147.
- Shi, L.Z., Fu, T., Guan, B., Chen, J., Blando, J.M., Allison, J.P., Xiong, L., Subudhi, S.K., Gao, J. und Sharma, P. (2016). Interdependent IL-7 and IFN- γ signalling in T-cell controls tumour eradication by combined alpha-CTLA-4+alpha-PD-1 therapy. *Nat. Commun.* **7**, 12335.
- Shiratori, T., Miyatake, S., Ohno, H., Nakaseko, C., Isono, K., Bonifacino, J.S. und Saito, T. (1997). Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* **6**, 583–589.
- Shortman, K. und Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19–30.
- Siska, P.J. und Rathmell, J.C. (2015). T cell metabolic fitness in antitumor immunity. *Trends Immunol.* **36**, 257–264.
- Springael, C., Thomas, S., Rahmouni, S., Vandamme, A., Goldman, M., Willems, F. und Vosters, O. (2007). Rottlerin inhibits human T cell responses. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 515–525.
- Starbeck-Miller, G.R., Xue, H.H. und Harty, J.T. (2014). IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *J. Exp. Med.* **211**, 105–120.

- Staron, M.M., Gray, S.M., Marshall, H.D., Parish, I.A., Chen, J.H., Perry, C.J., Cui, G., Li, M.O. und Kaech, S.M. (2014). The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8+ T cells during chronic infection. *Immunity* 41, 802–814.
- Steinhardt, J.J., Peroutka, R.J., Mazan-Mamczarz, K., Chen, Q., Houg, S., Robles, C., Barth, R.N., DuBose, J., Bruns, B., Tesoriero, R., et al. (2014). Inhibiting CARD11 translation during BCR activation by targeting the eIF4A RNA helicase. *Blood* 124, 3758–3767.
- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F. und Hawkins, P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567–570.
- Stoycheva, D., Deiser, K., Starck, L., Nishanth, G., Schluter, D., Uckert, W. und Schuler, T. (2015). IFN-gamma regulates CD8+ memory T cell differentiation and survival in response to weak, but not strong, TCR signals. *J. Immunol.* 194, 553–559.
- Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R. und Melief, C.J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 194, 823–832.
- Tai, X., van Laethem, F., Sharpe, A.H. und Singer, A. (2007). Induction of autoimmune disease in CTLA-4^{-/-} mice depends on a specific CD28 motif that is required for in vivo costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13756–13761.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W. und Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192, 303–310.
- Tejera, M.M., Kim, E.H., Sullivan, J.A., Plisch, E.H. und Suresh, M. (2013). FoxO1 controls effector-to-memory transition and maintenance of functional CD8 T cell memory. *J. Immunol.* 191, 187–199.
- Tiemessen, M.M., Baert, M.R.M., Kok, L., van Eggermond, M. C. J. A., van den Elsen, P. J., Arens, R. und Staal, F.J.T. (2014). T Cell factor 1 Represses CD8+ effector T cell formation and function. *J. Immunol.* 193, 5480–5487.
- Tinoco, R., Carrette, F., Barraza, M.L., Otero, D.C., Magana, J., Bosenberg, M.W., Swain, S.L. und Bradley, L.M. (2016). PSGL-1 Is an Immune Checkpoint Regulator that Promotes T Cell Exhaustion. *Immunity* 44, 1190–1203.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A. und Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541–547.
- Ubersax, J.A. und Ferrell, J.E., JR. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 530–541.

- van de Ven, K. und Borst, J. (2015). Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. *Immunotherapy* 7, 655–667.
- van Elsas, A., Hurwitz, A.A. und Allison, J.P. (1999). Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J. Exp. Med.* 190, 355–366.
- van Ham, M., Teich, R., Philipsen, L., Niemz, J., Amsberg, N., Wissing, J., Nimtz, M., Grobe, L., Kliche, S., Thiel, N., et al. (2017). TCR signalling network organization at the immunological synapses of murine regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.*
- van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E. und Schoenberger, S.P. (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* 2, 423–429.
- Vijayakrishnan, L., Slavik, J.M., Illes, Z., Greenwald, R.J., Rainbow, D., Greve, B., Peterson, L.B., Hafler, D.A., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., et al. (2004). An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 20, 563–575.
- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B. und Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405–413.
- Wang, R., Dillon, C.P., Shi, L.Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., et al. (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 35, 871–882.
- Wang, X., Chuang, H.C., Li, J.P. und Tan, T.H. (2012). Regulation of PKC-theta function by phosphorylation in T cell receptor signaling. *Front. Immunol.* 3, 197.
- Ward-Kavanagh, L.K., Lin, W.W., Sedy, JR und Ware, C.F. (2016). The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity* 44, 1005–1019.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H. und Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 270, 985–988.
- Wedeken, L., Ohnheiser, J., Hirschi, B., Wethkamp, N. und Klempnauer, K.H. (2010). Association of Tumor Suppressor Protein Pdcd4 With Ribosomes Is Mediated by Protein-Protein and Protein-RNA Interactions. *Genes Cancer* 1, 293–301.
- Wei, S.C., Levine, J.H., Cogdill, A.P., Zhao, Y., Anang, N.A., Andrews, M.C., Sharma, P., Wang, J., Wargo, J.A., Pe'er, D., et al. (2017). Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell*.
- Whitmire, J.K., Eam, B., Benning, N. und Whitton, J.L. (2007). Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4+ and CD8+ T cell memory. *J. Immunol.* 179, 1190–1197.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271–275.

- Wu, H., Neilson, JR, Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., Sharp, P.A. und Manjunath, N. (2007). miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PloS one* 2, e1020.
- Xia, J., Benner, M.J. und Hancock, R.E.W. (2014). NetworkAnalyst - integrative approaches for protein-protein interaction network analysis and visual exploration. *Nucleic Acids Res.* 42, W167-W174.
- Yang, H.S., Cho, M.H., Zakowicz, H., Hegamyer, G., Sonenberg, N. und Colburn, N.H. (2004). A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pcd4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3894–3906.
- Yang, H.S., Jansen, A.P., Komar, A.A., Zheng, X., Merrick, W.C., Costes, S., Lockett, S.J., Sonenberg, N. und Colburn, N.H. (2003). The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 26–37.
- Yao, S., Zhu, Y., Zhu, G., Augustine, M., Zheng, L., Goode, D.J., Broadwater, M., Ruff, W., Flies, S., Xu, H., et al. (2011). B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity* 34, 729–740.
- Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M. und Saito, T. (2010). Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* 33, 326–339.
- Zanin-Zhorov, A., Ding, Y., Kumari, S., Attur, M., Hippen, K.L., Brown, M., Blazar, B.R., Abramson, S.B., Lafaille, J.J. und Dustin, M.L. (2010). Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* 328, 372–376.
- Zarour, H.M. (2016). Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 1856–1864.
- Zhang, X. und Starnbach, M.N. (2015). An Excess of the Proinflammatory Cytokines IFN-gamma and IL-12 Impairs the Development of the Memory CD8+ T Cell Response to *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* 195, 1665–1675.
- Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.T., Gavin, M.A. und Rudensky, A.Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940.
- Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.-M., Harty, J.T., Badovinac, V.P. und Xue, H.-H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33, 229–240.
- Zhu, J., Yamane, H. und Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489.
- Zhu, Y., Yao, S. und Chen, L. (2011). Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity* 34, 466–478.

7 Abkürzungsverzeichnis

- Abb. - Abbildung
ADAP - Adhesion and degranulating promoting adapter protein
AP-1 - Activator protein-1
AP-2 - Adaptor protein complex-2
APZ - Antigen-präsentierende Zelle(n)
ATP - Adenosintriphosphat
Bcl10 - B-cell lymphoma/leukemia 10
BTLA - B- and T-lymphocyte attenuator
bzw. - beziehungsweise
CCR7 - C-C Chemokinrezeptor 7
CD - Cluster of Differentiation
CFSE - Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CTL - Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4 - Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4
d - Tag(e)
DAG - Diacylglycerin
dH₂O - destilliertes Wasser
DNA - Desoxyribonukleinsäure
EAE - Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
eIF - „eukaryotic initiation factor“
Eomes - Eomesodermin
FoxO1 - Forkhead box protein O1
FoxP3 - Forkhead box protein P3
Fra-2 - Fos-related antigen-2
GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITR - Glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein
Gls - Glutaminase
GO:BP - Gen-Ontologie für biologische Prozesse
h - Stunde(n)
HEK – humane embryonale Nierenzellen
HVEM - Herpesvirus entry mediator
ICOS - Inducible T-cell costimulator
IFN - Interferon
IL - Interleukin
IP - Immunpräzipitation
IP₃ - Inositol-(1,4,5)-trisphosphat
k.o. - knock out
kDA - Kilodalton
LAT - Linker for activated T cells
MALT1 - Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1

MAPK - Mitogen-activated protein kinase
MHC - Major Histocompatibility Complex
min - Minute(n)
miR - micro-RNA
mRNA(s) - „messenger“ Ribonukleinsäure(n)
mTOR - „mammalian target of rapamycin“
Myc - Avian Myelocytomatosis Virus Onkogen Homolog
NFAT - Nuclear factor of activated T cells
NF κ B - Nuclear Factor κ B
OVA - Ovalbumin
PCR - Polymerase-Kettenreaktion
PD-1 - Programmed cell death-1
PDCD4 - Programmed cell death 4
PD-L1 - Programmed cell death 1 ligand 1
PI3K - Phosphoinosid-3-Kinase
PIP₂ - Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PKA - Proteinkinase A
PKC - Proteinkinase C
PLC- γ - Phospholipase- γ
pMHC - Peptid + Major Histocompatibility Complex
PP2A - Proteinphosphatase 2A
PTM(s) - Post-translationale Modifikation(en)
RNA(s) - Ribonukleinsäure(n)
Runx2 - Runt-related transcription factor 2
T-bet - T-box Transkriptionsfaktor TBX21
TCF-1 - T-cell factor-1
TIM-3 - T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3
TLR - Toll-like-Rezeptoren
TNF - Tumornekrosefaktor
TZR - T-Zellrezeptor
U - Units (Einheiten)
u.a. - unter anderem
WCL - Gesamtzelllysat
WT - Wildtyp
z.B. - zum Beispiel
ZAP-70 - ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa

Anlage 1: Durch CTLA-4 regulierte Phosphorylierungsstellen in CD8⁺ T-Zellen.

Protein	Gen	ACC#	Phosphor.-stelle	log ₂ fache Änderung	p-Wert
NUCKS	<i>Nucks1</i>	Q80XU3	S19	1,3	<1,0E-12
JAML	<i>Amica1</i>	Q80UL9	S370	1,1	<1,0E-12
SH3BP2	<i>Sh3bp2</i>	Q06649	S425	1,1	<1,0E-12
NUCKS	<i>Nucks1</i>	Q80XU3	S181	1,0	<1,0E-12
PDCD4	<i>Pdcd4</i>	Q61823	S457	1,0	<1,0E-12
SLAMF7	<i>Slamf7</i>	Q8BHK6	S328	1,0	<1,0E-12
TNKS1BP1	<i>Tnks1bp1</i>	P58871	S1657	-1,0	<1,0E-12
PDCD4	<i>Pdcd4</i>	Q61823	S94	1,0	<1,0E-12
RNH2A	<i>Rnaseh2a</i>	Q9CWX8	S299	1,0	<1,0E-12
GAPVD1	<i>Gapvd1</i>	Q6PAR5	S902	-0,8	1,02E-12
CD43 (Leukosialin)	<i>Spn</i>	P15702	S285	0,8	7,17E-12
PAG	<i>Pag1</i>	Q3U1F9	S293	0,8	2,25E-11
SRRM2	<i>Srrm2</i>	Q8BTI8	S1631	0,8	1,43E-10
PKC-eta	<i>Prkch</i>	P23298	S675	0,7	4,23E-10
CENPC1	<i>Cenpc1</i>	P49452	S699	0,7	1,74E-09
SNIP1	<i>Snip1</i>	Q8BIZ6	S18	-0,7	4,88E-09
Sly1	<i>Sash3</i>	Q8K352	S26+27	0,7	6,97E-08
SIK3	<i>Sik3</i>	Q6P4S6	T411	-0,6	4,64E-07
hnRNPA1	<i>Hnrnpa1</i>	P49312	S6	-0,6	4,64E-07
NFATc2	<i>Nfatc2</i>	Q60591	S860	0,6	4,65E-07
SFRS7	<i>Srsf7</i>	Q8BL97	S212	0,6	8,56E-07
HP1-γ	<i>Cbx3</i>	P23198	S97	0,6	1,57E-06
SRRM2	<i>Srrm2</i>	Q8BTI8	S2084	-0,6	2,11E-06
KNL2	<i>Mis18bp1</i>	Q80WQ8	T516	0,6	2,11E-06
NCoA5	<i>Ncoa5</i>	Q91W39	S381	0,6	6,80E-06
HP1-γ	<i>Cbx3</i>	P23198	S99	0,6	2,12E-05
SRRM2	<i>Srrm2</i>	Q8BTI8	S777+S778	0,6	2,79E-05
RFC1	<i>Rfc1</i>	P35601	S365	0,6	2,79E-05
ZC3H18	<i>Zc3h18</i>	Q0P678	S530	0,6	3,67E-05
Niban	<i>Fam129a</i>	Q3UW53	S755	-0,6	3,67E-05
PATL1	<i>Patl1</i>	Q3TC46	T178+S184	0,6	6,32E-05
SSRP1	<i>Ssrp1</i>	Q08943	S657	0,6	8,24E-05
Fra-2	<i>Fosl2</i>	P47930	S200	-0,6	8,25E-05
Fra-2	<i>Fosl2</i>	P47930	S120	-0,6	8,26E-05
Trap150	<i>Thrap3</i>	Q569Z6	S238+S243	0,5	1,82E-04
NHE1	<i>Slc9a1</i>	Q61165	S707	0,5	1,82E-04
ZNF265	<i>Zranb2</i>	Q9R020	S120	0,5	2,35E-04
TOP2A	<i>Top2a</i>	Q01320	S1211	0,5	2,35E-04
MIA3	<i>Mia3</i>	Q8BI84	S1566	-0,5	2,35E-04
eIF3B	<i>Eif3b</i>	Q8JZQ9	S111	-0,5	2,35E-04
HP1-γ	<i>Cbx3</i>	P23198	S95	0,5	2,36E-04
CDK5RAP2	<i>Cdk5rap2</i>	Q8K389	S485	0,5	3,03E-04
SRRM2	<i>Srrm2</i>	Q8BTI8	S775+S778	0,5	3,91E-04
Ku70	<i>Xrcc6</i>	P23475	S518	-0,5	5,02E-04
WRNIP1	<i>Wrnip1</i>	Q91XU0	S153	-0,5	5,03E-04
AKNA	<i>Akna</i>	Q80VW7	S302	0,5	5,03E-04
BAZ1B	<i>Baz1b</i>	Q9Z277	S1464	0,5	6,44E-04
Aldolase A	<i>Aldoa</i>	P05064	S46	-0,5	6,44E-04
TXLNA	<i>Txlina</i>	Q6PAM1	S523	-0,5	8,22E-04
SRRM2	<i>Srrm2</i>	Q8BTI8	T1836	0,5	8,23E-04
PAG	<i>Pag1</i>	Q3U1F9	S295	0,5	8,23E-04
LRBA	<i>Lrba</i>	Q9ESE1	S982	-0,5	8,24E-04
NUP93	<i>Nup93</i>	Q8BJ71	S180	0,5	1,05E-03
SRRM1	<i>Srrm1</i>	Q52KI8	S795+S797	0,5	1,34E-03
FAM65B	<i>Fam65b</i>	Q80U16	S46	0,5	1,34E-03
SRRM1	<i>Srrm1</i>	Q52KI8	S574	0,5	2,15E-03
RANBP3	<i>Ranbp3</i>	Q9CT10	S148	-0,5	2,16E-03
PKD2	<i>Prkd2</i>	Q8BZ03	S211	0,5	2,16E-03
CARMA1	<i>Card11</i>	Q8CIS0	S930	0,5	2,16E-03
RalGAPA1	<i>Ralgapa1</i>	Q6GYP7	S796	0,5	2,72E-03
CDK12	<i>Cdk12</i>	Q14AX6	S332+S333	0,5	2,73E-03
SRRM2	<i>Srrm2</i>	Q8BTI8	S1343	0,5	3,44E-03
RPRC1	<i>Map7d1</i>	A2AJI0	S460	0,5	3,44E-03
TEX2	<i>Tex2</i>	Q6ZPJ0	S195	0,5	4,33E-03
CLASP2	<i>Clasp2</i>	Q8BRT1	S376	-0,5	4,33E-03
RIC8A	<i>Ric8a</i>	Q3TIR3	S435	-0,5	5,44E-03
NEK1	<i>Nek1</i>	P51954	S997	0,5	5,44E-03
PTPN12	<i>Ptpn12</i>	P35831	S434	0,5	6,81E-03
DEF6	<i>Def6</i>	Q8C2K1	S597	0,5	6,82E-03
SR-A1	<i>Scaf1</i>	Q5U4C3	S676+S682	0,5	1,06E-02
ELYS	<i>Ahctf1</i>	Q8CJF7	S1928	0,5	1,06E-02

Fortführung Anlage 1

DEAF1	<i>Deaf1</i>	Q9Z1T5	S212	0,5	1,07E-02
BRCA1	<i>Brca1</i>	P48754	S686	0,5	1,07E-02
MAP4	<i>Map4</i>	P27546	S517	-0,4	1,32E-02
ELYS	<i>Ahctf1</i>	Q8CJF7	S1928+S1931	0,4	1,32E-02
CC2D1B	<i>Cc2d1b</i>	Q8BRN9	S520	0,4	1,32E-02
VAV	<i>Vav1</i>	P27870	Y826	-0,4	1,64E-02
Arhgap1	<i>Arhgap1</i>	Q5FWK3	S51	-0,4	1,64E-02
WDR26	<i>Wdr26</i>	Q8C6G8	S101	-0,4	2,03E-02
GRAMD1B	<i>Gramd1b</i>	Q80T10	S274	-0,4	2,04E-02
SLP-76	<i>Lcp2</i>	Q60787	S210	-0,4	2,52E-02
STMN1	<i>Stmn1</i>	P54227	S46	0,4	3,10E-02
RANBP3	<i>Ranbp3</i>	Q9CT10	S58	0,4	3,11E-02
PCM-1	<i>Pcm1</i>	Q9R0L6	S1228	0,4	3,11E-02
Treacle	<i>Tcof1</i>	O08784	S1303	0,4	3,81E-02
PININ	<i>Pnn</i>	O35691	S66	0,4	3,81E-02
PININ	<i>Pnn</i>	O35691	S100	0,4	3,82E-02
DDX54	<i>Ddx54</i>	Q8K4L0	S774	0,4	3,82E-02
U2AF2	<i>U2af2</i>	P26369	S79	-0,4	4,68E-02

Anlage 2: Signifikant angereicherte GO:BP Kategorien von CTLA-4-regulierten Proteinen.

GO:BP Kategorie		Kategoriegröße	positive IDs	p-Wert
Zytokinproduktion	GO:0001816	190	P15702, Q8K352, Q6059, Q8CIS0, Q60787	3,85e-4
T-Zellaktivierung	GO:0042110	198	P15702, Q3U1F9, Q8K352, Q8CIS0, P27870	4,65e-4
Regulation der T-Zellaktivierung	GO:0050863	116	P15702, Q3U1F9, Q8K352, Q8CIS0	5,56e-4
RNA Prozessierung	GO:0006396	460	Q8BT18, P49312, Q8BL97, Q9R020, Q52KI8, Q5U4C3, O35691, Q8K4L0, P26369	1,78e-5
mRNA Prozessierung	GO:0006397	265	Q8BT18, P49312, Q8BL97, Q9R020, Q52KI8, Q5U4C3, O35691, P26369	2,33e-6
RNA-Spleißen	GO:0008380	207	Q8BT18, P49312, Q8BL97, Q9R020, Q52KI8, Q5U4C3, O35691, P26369	3,64e-7
mRNA metabolischer Prozess	GO:0016071	304	Q8BT18, P49312, Q8BL97, Q9R020, Q52KI8, Q5U4C3, O35691, P26369	6,41e-6
DNA Replikation	GO:0006260	178	P35601, Q08943, Q91XU0, Q9ESE1, P48754	2,86e-4
Mikrotubuli Depolymerisation	GO:0007019	18	Q8BRT1, P27546, P54227	2,58e-5
Microtubuli Polymerisation oder Depolymerisation	GO:0031109	36	Q8BRT1, P27546, P54227	2,17e-4
Regulation der Mikrotubuli Polymerisation oder Depolymerisation	GO:0031110	31	Q8BRT1, P27546, P54227	1,38e-4
Regulation von Microtubuli-basierten Prozesse	GO:0032886	49	Q8BRT1, P27546, P54227	5,43e-4

Anlage 3: Von PDCD4 gebundene RNA Moleküle in CD8⁺ T-Zellen.

RNA	Protein	ACC#	log ₂ fache Änderung	p-Wert
<i>Gls</i>	Glutaminase	D3Z7P3	1,09	0,005
<i>Tyk2</i>	Tyk2	Q9R117	1,25	0,014
<i>Cxadr</i>	CXADR	P97792	1,13	0,025
<i>Orc3</i>	ORC3L	Q9JK30	0,96	0,026
<i>Esrp2</i>	RBM35B	Q8K0G8	1,13	0,027
<i>C1orf21</i>	C1orf21	Q8K207	1,03	0,027
<i>Hmga2-ps1</i>			1,03	0,027
<i>Btbd6</i>	BTBD6	Q8K2J9	1,10	0,031
<i>Brd2</i>	BRD2	Q7JJ13	1,10	0,032
<i>Mllt11</i>	MLLT11	P97783	1,05	0,033
<i>Ankrd61</i>	ANKRD61	Q9CQM6	0,94	0,038
<i>Brsk2</i>	BRSK2	Q69Z98	1,05	0,039
<i>1110002L01Rik</i>		Q8CBQ7	0,94	0,040
<i>Spsb2</i>	SPSB2	Q88838	0,94	0,040
<i>Rab6b</i>	RAB6B	P61294	0,94	0,040
<i>Dnmt3aos</i>		Q3UCH3	1,00	0,041
<i>Zfp174</i>	ZNF174	B9EJW5	1,00	0,041
<i>Ints2</i>	INTS2	Q80UK8	0,88	0,047
<i>B3gnt3</i>	B3GNT3	Q5JCS9	0,89	0,048
<i>Trio</i>	TRIO	Q0KL02	0,97	0,048
<i>Senp3</i>	SENP3	Q9EP97	0,96	0,049

9 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Brunner-Weinzierl für die Möglichkeit in diesem Thema in ihrer Arbeitsgruppe an der Universitätskinderklinik Magdeburg zu promovieren. Ich bedanke mich für die kontinuierliche Unterstützung und Förderung bei der Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellung und bei der Anfertigung der Publikation und Dissertation.

Den internen und externen Gutachtern bzw. Gutachterinnen danke ich an dieser Stelle für die Übernahme der Gutachten und für deren Interesse an diesem Thema.

Ich bedanke mich vor allem bei Prof. Jänsch, Prof. Klawonn und Dr. Wissing vom HZI Braunschweig für die massenspektrometrische Analyse und die Hilfe bei der Auswertung des dabei gewonnenen Datensatzes. Des Weiteren danke ich Dr. Schanze und Dr. Lienenklaus für die geleistete Hilfestellung.

Ein ganz großer Dank geht an gegenwärtige und ehemalige Kollegen der AG Brunner-Weinzierl sowie an meine Eltern und meine Freunde, die mich die ganze Zeit über unterstützt und beraten haben.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen naturwissenschaftlichen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Magdeburg, den 26.09.2017

Holger Lingel