



Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Virologie und Immunbiologie

**Die Bedeutung von CD28 vermittelter Kostimulation für
CD8 T-Zell-Gedächtnisreaktionen**

**The role of CD28 costimulation for CD8 T-cell memory
responses**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: Infection and Immunity
Vorgelegt von

Monika Gabriele Fröhlich

aus Würzburg

Würzburg, 2017

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hünig

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Lutz

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Rudel

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Bedeutung von CD28 vermittelter Kostimulation für CD8 T-Zell-Gedächtnisreaktionen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Datum, Ort

Unterschrift

Danksagung

Ich bedanke mich von Herzen bei allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Hünig bedanken. Sie haben mich mit ihren Rückmeldungen stets vorangebracht und mir neue Ideen für meine Experimente gegeben. Auch bei knapp bemessener Zeit habe ich stets ihr offenes Ohr angetroffen und habe mich von Ihnen stets gut betreut gefühlt. Ich danke Ihnen auch von Herzen für Ihren Einsatz für eine Anstellung während meiner ersten Schwangerschaft und Ihre positive Einstellung bezüglich des AG Hünig Nachwuchses. Zudem haben Sie mir ermöglicht, neben der Doktorarbeit mein Lehramtsstudium fortzuführen, und dafür gebührt Ihnen noch ein dickes Extradankeschön.

Ich bedanke mich auch bei meinen weiteren Betreuern der Doktorarbeit, Prof. Dr. Manfred Lutz und Prof. Dr. Thomas Rudel. In unseren Meetings hat mir Ihre Sicht von außen geholfen, meine Versuche in einem anderen Licht zu betrachten und weiterzuentwickeln.

Weiterhin danke ich allen meinen Kollegen, insbesondere der AG Hünig. Liebe Susi und Dani, ihr habt mir viel bei meinen Experimenten geholfen, ich danke euch für eure Freundschaft und möchte euch nicht mehr missen! Liebe Tea, danke, dass du mich in die Thematik und die Tierexperimente eingearbeitet hast, lieber Christian, danke für deine experimentelle Hilfe, liebe Anna und liebe Madeleine, Danke für all die Dinge, die den Laboralltag abwechslungsreicher gestaltet haben. Liebe Noelle, Danke, dass du mir Schreibasyl in deinem Labor gewährt hast und Danke für die vielen tollen Gespräche. Danke an Lisa und Nelli und alle weiteren Kaffeetrinker des 2. Stocks für die vielen schönen Pausen und fachlichen Diskussionen!

Ich möchte auch allen Tierpflegern und Tierstallchefs unseres Instituts danken, dafür, dass ihr euch mit vollem Einsatz um meine Mäuse gekümmert habt, für das tolle Management trotz dreifacher MPV Infektionen und für die Erfüllung gelegentlicher Sonderwünsche.

Vielen Dank an Gerlinde und Traudel, die stets für einen Kühlraum voll mit Lösungen und Reagenzien gesorgt haben.

Ein dickes Dankeschön der besonderen Art geht an meine Familie. Danke für die Unterstützung und für das, was ihr seid!

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	3
Danksagung.....	4
Summary.....	8
Kurzfassung.....	9
1 Einleitung.....	11
1.1 Bestandteile des adaptiven Immunsystems und Ablauf einer Immunreaktion.....	11
1.2 Ablauf einer Immunreaktion und Generierung eines immunologischen Gedächtnisses.....	13
1.3 T-Zell Aktivierung	17
1.4 Kostimulatorische Signale in primärer und sekundärer Immunantwort....	20
1.5 Methodik der Deletion und Blockade von CD28.....	25
1.6 Zielsetzung der Arbeit	28
1.7 Erklärung zur Mitwirkung und vorrausgehende Publikationen.....	29
2 Material.....	30
2.1 Mäuse	30
2.2 Primer.....	30
2.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien	31
2.4 Antikörper.....	32
2.5 Magnetische Partikel und Färbereagenzien	34
2.6 Verbrauchsmaterial	34
2.7 Chemikalien und biochemische Agenzien.....	35
2.8 Geräte	37
2.9 Software	39
3 Methoden	40
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	40
3.1.1 DNA Extraktion auf Aufbereitung	40
3.1.2 PCR und Gelelektrophorese	40
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	41
3.2.1 Bakterienkultur	41
3.2.2 Analyse von Lebersuspensionen	42
3.3 Tierexperimentelle Methoden.....	42
3.3.1 Züchtung der Linie OT-I Thy1.1 FLCK	42
3.3.2 Versuchsbedingte Zuchten.....	42
3.3.3 Genotypisierung	43
3.3.4 Mausinfektionen	43

3.3.5	Mausinjektionen	43
3.3.6	Schlundsondierung mit Tamoxifen	43
3.3.7	Adoptiver Zelltransfer	44
3.4	Zellbiologische Methoden.....	44
3.4.1	Aufreinigung von PBMCs	44
3.4.2	Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen	44
3.4.3	Bestimmung der Zellzahl.....	45
3.4.4	Aufreinigung CD8 positiver Milzzellen	45
3.4.5	Zellkultivierung	45
3.4.5.1	Übernachtskultur für IFN- γ Sekretion.....	45
3.4.5.2	Übernachtskultur für IFN- γ ELISPOT.....	46
3.4.5.3	Kultur für Degranulationsassay	46
3.5	Immunologische Methoden	47
3.5.1	FACS-Analyse (Durchflusscytometrie)	47
3.5.1.1	Extrazelluläre Färbung.....	47
3.5.1.2	Streptamer Färbung.....	47
3.5.1.3	Intrazelluläre Färbung im Cytoplasma	47
3.5.1.4	Intrazelluläre Färbung im Kern.....	48
3.5.1.5	Nachweis von E18	48
3.5.2	ELISPOT	49
4	Ergebnisse.....	50
4.1	Einfluss der globalen Deletion oder Blockade der CD28 vermittelten Kostimulation auf die sekundäre Immunantwort von CD8 T-Zellen.....	50
4.1.1	Beeinträchtigung der Kostimulation durch globale Deletion von CD28 führt zu eingeschränkter sekundärer Immunantwort von CD8 T-Zellen.....	50
4.1.2	Beeinträchtigung der Kostimulation durch Blockade der CD28-CD80/86 Interaktion führt zu eingeschränkter sekundärer Immunantwort.....	58
4.1.3	Transiente Blockade der Kostimulation während der Primärantwort und der Etablierung des Gedächtnisses hat keinen Einfluss auf die sekundäre Immunantwort.....	60
4.1.4	Deletion von CD4 T-Zellen während der Sekundärinfektion führt zu verstärkter Effektorantwort – auch unter Blockade von CD28.....	63
4.2	Analyse der Primär- und Sekundärantwort von transferierten, CD28 deletierbaren CD8 T-Zellen in Konkurrenz mit endogenen CD28 suffizienten Zellen	66
4.2.1	Titration der transferierten Zellen	66
4.2.2	Selektive Deletion des CD28 Gens in transferierten Zellen vor der Primärantwort führt zu eingeschränkter Expansion mit verstärkter Effektorfunktion	68
4.2.3	Selektive Deletion des CD28 Gens in transferierten Zellen führt zu eingeschränkter Expansion bei der Sekundärantwort	73
4.2.4	Selektive Deletion von CD28 am Höhepunkt der Primärantwort hat keinen Einfluss auf die Entwicklung und den Abruf des Gedächtnisses	77

5	Diskussion	80
	Bilderverzeichnis.....	89
	Abkürzungsverzeichnis	97
	Literaturverzeichnis	101
	Lebenslauf	108

Summary

Immunological memory is of vital importance for the fight against reoccurring pathogens and to protect organisms from infections. Important players are CD8 memory T-cells that are created mainly during intracellular infections to boost rapid cellular defenses upon reinfection. The understanding of the generation, control and reactivation of these memory cells is crucial to comprehend and regulate mechanisms of memory immune reactions. The discovery of the TCR and of the costimulator CD28 depict important milestones towards the understanding of activation of memory cells – and naive cells, of course. The paradigm of the two signal theory in the activation of naive T-cells has long been accepted but the role of CD28 mediated costimulation in secondary CD8 T-cell responses remains controversial. Several methodological approaches to investigate the impact of costimulation on memory CD8 T-cells were used in this work, all proving the importance of CD28 to mount robust memory responses. CD28 blocking antibodies and also inducibly CD28 deleting mice were used in both primary and secondary infections with Ovalbumin-producing *Listeria monocytogenes* to establish an impaired clonal expansion of CD8 memory T-cells in the absence of CD28 function. Furthermore, effector functions such as degranulation and IFN- γ production were reduced during the secondary immune response. Specific deletion of CD28 in CD8 cells in mice that were seeded with a naturally occurring number of antigen specific, CD28 deletable naive CD8 T-cells provided evidence for the importance of costimulatory signals for the clonal expansion but also revealed an increase of effector functions in the absence of CD28 both in the primary and in the secondary response. These findings suggest a participation of other CD28 responsive cells such as T-helper cells by supporting CD28 deleted effector cells to exert their effector functions under the terms of CD28 sufficiency in the other parts of the immune system. Furthermore, I found that the progeny of primed CD8 T-cells can adapt to the CD28 deficient phenotype if given sufficient time before reactivation.

Kurzfassung

Immunologische Gedächtnisreaktionen sind die Grundlage um wiederkehrende Erreger schnell und effizient zu bekämpfen und um einen Impfschutz zu generieren. Das zellvermittelte Gedächtnis wird unter anderem durch CD8 Gedächtnis-T-Zellen aufgebaut, welche vor allem im Kontext von Immunreaktionen gegen intrazellulärer Erreger vonnöten sind, um bei Reinfektion mit den Erregerstämmen einen schnellen Schutz zu gewährleisten. Ein detailliertes Wissen über die Generierung, Kontrolle und Reaktivierung der Gedächtniszellen ist nützlich, um Gedächtnisreaktionen verstehen und lenken zu können. Durch die Entdeckung des TZR und CD28 wurden Meilensteine für das Verständnis der T-Zellaktivierung gelegt und die Grundlage geschaffen, CD8 Gedächtnisreaktionen zu verstehen. Auch wenn für primäre Immunreaktionen die „2-Signal-Theorie“ lange als erwiesen gilt, so blieb die Rolle der Kostimulation für Gedächtnisreaktionen lange umstritten. In dieser Arbeit wurden verschiedene methodische Herangehensweisen verwendet, mit denen durchgehend die Bedeutung von CD28 vermittelter Kostimulation für immunologische CD8 T-Zell-Gedächtnisreaktionen nachgewiesen wurde. CD28 blockierende Antikörper und CD28 induzierbar deletierbare Mauslinien wurden im Modellinfektionssystem mit Ovalbumin produzierenden *Listeria monocytogenes* zur Analyse der Primär- und Sekundärantworten verwendet. Mit diesen Methoden konnte eine Beeinträchtigung der Expansion von CD8 Gedächtniszellen in Abwesenheit von CD28 bewiesen werden. Weiterhin werden Effektorfunktionen wie Degranulation und Produktion von IFN- γ während der Sekundärinfektion in Abwesenheit von Kostimulation eingeschränkt. Mit Hilfe von Experimenten, bei denen CD28 suffizienten Mäusen eine geringe Anzahl an naiven, antigenspezifischen, CD28 deletierbaren CD8 T-Zellen transferiert wurden, wurde die Bedeutung der Kostimulation für die Expansion von Gedächtniszellen bestätigt, jedoch konnte überraschenderweise auch ein Anstieg der Effektorfunktionen in Abwesenheit von CD28 sowohl während der Primär- als auch der Sekundärantwort dokumentiert werden. Diese zur globalen Blockade bzw. Deletion widersprüchlichen Ergebnisse lassen eine Beteiligung anderer CD28 abhängiger Zelltypen an der Induktion der Effektorfunktionen der CD8 T-Zellen plausibel erscheinen, wie zum Beispiel Einflüsse von T-Helferzellen, welche die Effektorfunktionen positiv verstärken,

solange sie selbst Kostimulationssignale empfangen können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich Gedächtniszellen an den CD28 defizienten Phänotyp – eine CD28 intakte immunologische Umgebung vorausgesetzt – adaptieren können, wenn ausreichend Zeit nach Deletion und vor Sekundärinfektion verstreichen konnte.

1 Einleitung

Lebewesen stehen in ständiger Wechselwirkung miteinander. Durch positive Interaktionen ergeben sich Vorteile für beide Seiten, negative Interaktionen führen zur Schädigung oder Auslöschung einer Seite. Solchen Wechselwirkungen sind Lebewesen jedoch nicht schonungslos ausgeliefert, sondern sie entwickelten im Laufe der Stammesgeschichte herausragende Anpassungen, um sich gegen den Angriff anderer Organismen zu wehren. So hat sich das Immunsystem im Laufe der Evolution von einer einfachen, angeborenen Immunantwort, bestehend aus mechanischen Barrieren wie Schleimhäuten, zellulären Bestandteilen wie NK-Zellen, Granulozyten und Makrophagen und humoralen Bestandteilen wie dem Komplementsystem und Cytokinen hin zu einer spezifischen adaptiven Immunantwort weiterentwickelt bzw. wurde ergänzt und verbessert. Die auf den ersten Blick einfache angeborene Immunität kann keinesfalls durch die adaptive Immunität ersetzt werden. Im Gegenteil – beide Systeme arbeiten eng zusammen bei der Bekämpfung von Krankheitserregern und der Beseitigung entarteter körpereigener Komponenten. Solch eine Zusammenarbeit ist nur durch gemeinsame Anpassungen der Komponenten aneinander möglich. So sind im Immunsystem eine Vielzahl an Kommunikationsmöglichkeiten entstanden, mit denen die einzelnen Bestandteile Informationen austauschen und eine Immunantwort lenken können (zusammengefasst in (Danilova 2012)).

Aufgabe dieser Doktorarbeit war es, einen Kommunikationsweg, genauer einen Rezeptor, der mehrere Kommunikationswege betrifft, bei bestimmten Immunreaktionen zu untersuchen. Nach einem genaueren Blick auf das adaptive Immunsystem und die Mechanismen der zellulären Interaktion wird die Aufgabenstellung der Doktorarbeit im Detail erläutert.

1.1 Bestandteile des adaptiven Immunsystems und Ablauf einer Immunreaktion

Die adaptive Immunität zeichnet sich dadurch aus, dass spezifische Rezeptoren, die gezielt einen bestimmten Erreger erkennen, im Laufe einer Immunantwort aus einem zufällig generierten Repertoire selektiert und stark vermehrt werden. Durch

genetische Mutations- und Rekombinationsprozesse wird eine enorme Vielfalt an unterschiedlichen Rezeptorspezifitäten generiert, welche im Genom des Organismus nicht zu finden ist. Solche hochspezifischen Rezeptoren finden sich auf zwei bestimmten Zelltypen, die gemeinsam das adaptive Immunsystem bilden. Die humorale Immunantwort wird durch verschiedenen Typen von B-Lymphozyten vermittelt, welche nach Antigenerkennung hochspezifische Antikörperproteine synthetisieren. Antikörper dienen – gebunden an der Zelloberfläche – als Erkennungsrezeptoren für Antigene und werden in großer Menge von Plasmazellen sezerniert, um an Fremdstrukturen zu binden, damit diese für die Entsorgung im Körper durch Phagozytose oder durch Aktivierung des Komplementsystems unschädlich gemacht werden können (zusammengefasst in (Chaplin 2010)).

Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Lymphozyten vermittelt, welche sich durch einen hochspezifischen T-Zell Rezeptor (TZR) ausweisen, der für die gezielte Erkennung von Antigenen verantwortlich ist. Durch eine große Vielfalt an Subpopulationen der T-Lymphozyten erfüllen diese verschiedenste Funktionen bei Immunreaktionen. Zellen mit dem Korezeptor CD4 untergliedern sich in T-Helfer 1 Zellen (T_H1), die vor allem durch Sekretion des Zytokines IFN- γ die zelluläre Immunität unterstützen und so gegen intrazelluläre Erreger kämpfen. T_H2 Zellen hingegen unterstützen vor allem durch die Produktion der Interleukine 4, 5 und 13 die humorale Immunantwort. Weitere Gruppen wie T_H17 Zellen sind an der Bekämpfung extrazellulärer Erreger sowie an Autoimmunreaktionen beteiligt. Regulatorische T-Zellen (T_{regs}) bilden eine lebenswichtige Untergruppe, die Immunreaktionen und Autoimmunantworten durch verschiedene Mechanismen, wie zellulären Kontakt oder sezernierte Faktoren wie Interleukin 10 (IL-10) oder transforming growth factor β (TGF- β), einschränken und zum Abklingen bringen. Weitere Untergruppen sollen hier nicht aufgeführt werden, jedoch wird angemerkt, dass die Gruppierung verschiedener TH-Lymphozyten ein Feld aktiver Forschung darstellt, das durch Umstrukturierung und Neudefinition von Untergruppen gekennzeichnet ist.

Den Lymphozyten, welche den Korezeptor CD4 exprimieren und als Helfer- bzw. regulatorische T-Zellen bezeichnet werden, stehen die zytotoxischen T-Zellen gegenüber, welche den Korezeptor CD8 exprimieren und infizierte und entartete

körper eigene Zellen abtöten. Dies geschieht durch Sekretion von Proteinen, welche die Zellmembran lysieren (Perforin) oder Apoptose in Zielzellen auslösen (Granzyme). In der vorliegenden Doktorarbeit wurden cytotoxische CD8 Lymphozyten untersucht, wobei der Schwerpunkt auf CD8 Gedächtniszellen lag.

1.2 Ablauf einer Immunreaktion und Generierung eines immunologischen Gedächtnisses

Dringen Erreger in einen Organismus ein, werden diese von dendritischen Zellen aufgenommen, prozessiert und deren Antigene in Lymphknoten oder Milz naiven T-Zellen präsentiert. Naive CD4 Lymphozyten werden aktiviert, produzieren zunächst IL-2 und abhängig von der Natur des Cytokinmilieus der entsprechenden Infektion differenzieren sie in Richtung T_H1 , T_H2 oder T_H17 Helferzelle. Die Aktivierung von CD8 Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) geschieht meist in Zusammenarbeit mit T_H1 Zellen, welche zusätzliche Zytokine produzieren, sodass naive CD8 Zellen zu funktionstüchtigen CD8 Effektorzellen heranreifen. Nach Aktivierung proliferieren die Lymphozyten und bilden einen großen CD8 Effektorzellpool, welcher zu infizierten Geweben wandert, infizierte Körperzellen zerstört und in Zusammenarbeit mit dem angeborenen Immunsystem und durch Unterstützung der Zytokine der Helferzellen die Infektion eingrenzt und unterbindet. Die Effektorzellen haben meist eine kurze Lebenszeit und sterben nach einer Immunantwort durch einen Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD). Wenige Zellen (maximal 5%) entgehen dem induzierten Zelltod und verbleiben als langlebige Gedächtniszellen. Bei erneutem Erreger- bzw. Antigenkontakt werden Gedächtniszellen rascher als naive CD8 T-Zellen reaktiviert und bilden einen größeren Effektorpool, der die erneute Infektion effektiver beseitigt. Auch nach Abklingen der Sekundärinfektion verbleiben Gedächtniszellen, die bei erneuter Infektion rasch expandieren. Durch die verstärkte Expansion der Gedächtniszellen bei Zweitkontakt werden Erreger im Vergleich zur Erstinfektion rascher und effektiver beseitigt, sodass der Organismus nun hohe Erregerdosen bekämpfen kann, welche bei Erstinfektion letal gewesen wären.

Die Faktoren, die eine Effektorzelle als Gedächtniszelle überleben lassen, sowie die unterschiedlichen Typen von Gedächtniszellen sind aktuell im Forschungsfeld und sollen kurz zusammengefasst werden. So muss die verbreitete Einteilung von

Gedächtniszellen in zentrale (T_{cm} , central memory) und Effektor- Gedächtniszellen (T_{em} , effector memory) durch die Expression von CD62L und CCR7 (Sallusto, Lenig et al. 1999) neu ausgelegt werden. Bisher wurden T_{cm} -Zellen durch die Expression von CD62L und CCR7 identifiziert, denn diese Moleküle ermöglichen den Eintritt in Lymphknoten, wo sie auf erneuten Antigenkontakt warten. T_{em} -Zellen hingegen exprimieren keines der beiden Moleküle und durchwandern das Gewebe auf der Suche nach Antigenkontakt. Diese Einteilung ist jedoch keinesfalls statisch, denn die Phänotypen und Funktionen der Gedächtnispopulation verändern sich mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Infektion (Eberlein, Davenport et al. 2016). Neuere Arbeiten (Martin and Badovinac 2016) verwenden zur Klassifizierung der Gedächtniszellen zusätzlich den Marker CX3CR1 (Fractalkin), der Gedächtniszellen in drei Subpopulationen aufteilt und bisherige Funktionen der T_{cm} und T_{em} neu aufrollt. T_{cm} -Lymphozyten entsprechen CX3CR1 negativen Zellen und CX3CR1 stark exprimierende Zellen (CD62L-) sind vergleichbar mit T_{em} -Lymphozyten, jedoch wurden diese Zellen verstärkt im Lymphknoten gefunden und Eintrittsmechanismen unabhängig der HEVs (high endothelial venules) postuliert. Für die Überwachung der Gewebe sind hingegen jene Zellen mit einer intermediären CX3CR1 Expression verantwortlich. Die Untergruppe zeigt zudem die höchste Proliferationsrate, die nicht nur die eigene Population aufrechterhält, sondern zudem T_{cm} Lymphozyten generiert. Mit dieser zusätzlichen Einteilung der Gedächtniszellen kann also eine neue Untergruppe identifiziert werden und zusätzlich die Abstammung der Subpopulationen aufgedeckt werden.

Auch wenn verschiedene Subpopulationen identifiziert werden können, so sind die Mechanismen, die der Differenzierung naiver Zellen in Effektor- oder Gedächtniszellen zugrunde liegen, bisher nicht eindeutig erforscht, was zur Formulierung verschiedener Hypothesen führte. Nach der „Zuerst die Effektoren – Hypothese“ (effectors first) differenzieren naive Zellen zuerst in Effektor- und später in Gedächtniszellen (Kaech, Hemby et al. 2002). Jedoch wurde in vielen neueren Studien gezeigt, dass Gedächtniszellen kein voll ausdifferenziertes Effektorstadium durchleben, sondern direkt aus naiven Zellen entstehen, parallel zu Effektorzellen (Zhang, Byrne et al. 2007). Durch Unterschiede in von Antigen, Cytokinen, Kostimulation und CD4 T-Zell Hilfe ausgelösten Signalkaskaden werden vielmehr die verschiedenen Entwicklungspotentiale beeinflusst. Aufgrund

dieser Erkenntnisse wurde die „Hypothese der abnehmenden Differenzierungspotentiale“ formuliert (decreasing potential hypothesis). Andere Studien unterstützen ein Modell der asymmetrischen Zellteilung, wodurch zelluläre Bestandteile (Proteine wie IFN- γ R, T-Bet, Granzym B) ungleichmäßig auf Tochterzellen verteilt werden und so unterschiedliche Entwicklungsschicksale festlegen (Chang, Palanivel et al. 2007). Die einzelnen Studien widersprechen sich nicht zwingend, denn je nach Fragestellung und methodischer Umsetzung wurde gezielt in Richtung verschiedener Hypothesen geforscht. Bisher konnte auch nicht geklärt werden, ob das Schicksal einer Effektorzelle festgelegt ist oder noch in andere Richtungen gelenkt werden kann (Gerritsen and Pandit 2016).

Wenn auch die Plastizität des Entwicklungsschicksals naiver CD8 T-Lymphozyten noch nicht in Detail erforscht ist, so lassen sich dennoch im Verlauf der frühen Aktivierung und Expansion aktivierter CD8 T-Zellen verschiedene Effektor- und Gedächtnisvorläuferpopulationen eindeutig nachweisen, denen unterschiedliche Entwicklungspotentiale zugeschrieben werden. Mit Hilfe der Marker KLRG-1 und CD127 (Interleukin-7 Rezeptor) lassen sich aktivierte CD8 T-Lymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion in die Subpopulationen frühe Effektorzellen (EEC, early effector cells), kurzlebige Effektorzellen (SLEC, short lived effector cells), doppelpositive Effektorzellen (DPEC, double positive effector cells) und Gedächtnisvorläufer-Effektorzellen (MPEC, memory precursor effector cells) einteilen (Sarkar, Kalia et al. 2008), (siehe Abbildung 1).

So exprimieren MPEC reduzierte Mengen an KLRG-1 und verstärkt CD127, wohingegen SLEC KLRG-1 stark exprimieren und CD127 herunterreguliert haben. DPEC und EEC sind doppelt positiv bzw. negativ für beide Marker und werden als Zwischenstadien bei der Weiterdifferenzierung zu MPEC und SLECs angesehen. Experimente über die Funktionalität der Subpopulationen offenbarten jedoch trotz unterschiedlicher Phänotypen vergleichbare *in vivo* Degranulationsaktivität (Yuzefpolskiy, Baumann et al. 2015). Das Ausmaß der Aktivität hingegen ist ortsabhängig, sodass in nicht lymphoiden Geweben verstärkt Degranulation stattfindet, wohingegen in lymphoiden Organen, in welchen verstärkt MPEC auftreten, weniger Degranulation erfolgt.

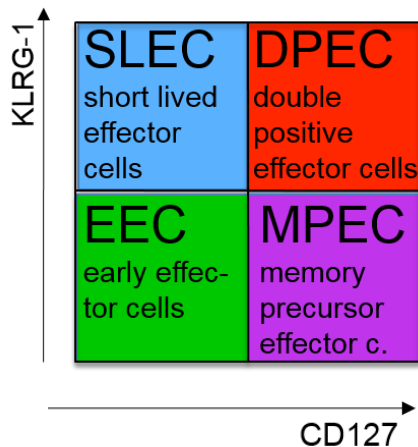


Abbildung 1: Einteilung aktivierter CD8 Lymphozyten in Subpopulationen

Durch Expression von CD127 und KLRG-1 werden aktivierte CD8 T-Zellen in SLEC (KLRG-1⁺, CD127⁻), DPEC (KLRG-1⁺, CD127⁺), EEC (KLRG-1⁻, CD127⁻) und MPEC (KLRG-1⁻, CD127⁺) eingeteilt.

Es stellte sich auch heraus, dass Gedächtnisvorläuferzellen bei der Anwesenheit von Antigen durch ein Effektorstadium gehen können. MPEC und SLEC besitzen das gleiche Effektorpotential, allerdings wird es von MPEC weniger ausgeschöpft, da diese bevorzugt in lymphoiden Geweben, in denen geringere Antigenkonzentration vorliegt, vorkommen. Es wurde auch gezeigt, dass Gedächtnisvorläuferzellen die Effektorfunktionen schneller abschalten. So können Stoffwechselressourcen eingespart werden, sodass aus Gedächtnisvorläuferzellen Populationen mit besseren metabolischen Reserven hervorgehen, die ein Langzeitüberleben vereinfachen. Hingegen reifen Zellen durch verstärkten Antigenkontakt und starke Degranulation zu potenten Killerzellen, die durch metabolische Verausgabung zugrunde gehen und nicht auf lange Zeit überleben können. Diese Studie unterstützt wiederum die „Hypothese der abnehmenden Differenzierungspotentiale“, denn hier wurde das Entwicklungsschicksal klar durch Unterschiede im Antigenkontakt beeinflusst. Generell kann aus der Ausbildung der verschiedenen Subpopulationen auch die Intensität der Immunantwort hergeleitet werden, denn eine starke Immunantwort geht einher mit einer ausgeprägten Effektorzellpopulation (EEC), wohingegen schwache Immunantworten mit weniger ausdifferenzierten Populationen (MPEC, EEC) korrelieren.

Nicht nur durch Oberflächenmarker und Effektorfunktionen lassen sich Effektor- und Gedächtniszellen unterscheiden, sondern auch durch die Anwesenheit und Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren. Viele dieser Transkriptionsfaktoren agieren als Paare, die wie in einem Waagschalenmodell eine Zelle in Richtung Gedächtnis- oder Effektorschicksal leiten (zusammengefasst in (Kaech and Cui

2012)). Ein Paar bilden T-bet und Eomes, die zunächst zusammen bei der Aktivierung naiver CD8 T-Zellen zusammenwirken und so die Expression von IFN γ , Granzym B, Perforin, CXCR3 und CXCR4 steuern. Bei der weiteren Differenzierung der Zellen zeigen sich jedoch reziproke Expressionsmuster, denn das Verhältnis T-Bet/Eomes korreliert mit dem Entwicklungsschicksal in solch einer Weise, dass hohe T-bet und niedrige Eomes Expression mit einem Effektorphänotyp einhergehen und das entsprechend umgekehrte Verhältnis der Transkriptionsfaktoren mit einem Gedächtnisphänotyp (Joshi, Cui et al. 2011). Auch Blimp-1 und Bcl-6 wirken als Antagonisten, die als genetischer Schalter das Entwicklungsschicksal steuern (Cui, Liu et al. 2011). Hohe Blimp-1 Expression führt zu einem KLRG-1 high CD127 low Effektorphänotyp, wohingegen hohe Bcl-6 Werte mit CD127 high Gedächtniszell-Vorläufer Populationen zusammenhängen.

1.3 T-Zell Aktivierung

Die Intensität oder Dauer der Interaktion mit dendritischen Zellen bzw. der Antigenkontakt stellt für CD8 Lymphozyten einen zentralen Faktor dar, der deren weiteres Entwicklungsschicksal beeinflusst (Lanzavecchia and Sallusto 2002). Wie oben aufgeführt sind T-Lymphozyten darauf spezialisiert, ein bestimmtes Antigen (Peptid bestimmter Länge und Aminosäuresequenz) zu erkennen. Diese Peptide werden dann erkannt, wenn sie an bestimmte Trägermolekülen, die MHC Moleküle, gebunden sind. CD4 T-Lymphozyten erkennen generell Peptide gebunden an MHC Moleküle der Klasse II, wohingegen CD8 Lymphozyten mit MHC Klasse I Molekülen interagieren, da das CD4 bzw. CD8 Molekül mit nicht polymorphen Regionen des MHC II bzw. MHC I Moleküls interagiert. Generell wird bei der Ausbildung einer T-Zell Interaktion zunächst über antigen-unspezifische Kontakte ein Zell-Zell-Kontakt hergestellt, wodurch die Interaktion des TZR mit den MHC Molekülen ermöglicht wird. Passen TZR und Antigen zusammen, so wird eine immunologische Interaktion nach einem bestimmten Muster ausgebildet. Lange wurde die Ausbildung einer immunologischen Synapse als Interaktionsmodell zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle postuliert (Grakoui, Bromley et al. 1999). Demnach findet im Zentrum die TZR/MHC, sowie CD28/B7.1/7.2 Interaktion statt (cSMAC, central supramolecular activation complex). Ein peripherer Ring (pSMAC), gebildet aus dem Adhäsionsmolekülen

CD2/CD58, beide Mitglieder der SLAM Familie (signaling lymphocyte activation molecule), und LFA1/ICAM1 umgibt diesen inneren Bereich. Im distalen äußeren Bereich (dSMAC) befinden sich Aktivierungsmoleküle wie CD43 und CD45 mit großen Ektodomänen. Es hat sich aber gezeigt, dass effektive T-Zell-Aktivierung meist außerhalb der cSMAC Zone stattfindet (Dustin, Chakraborty et al. 2010). In naiven T-Zellen sind TZR in Nanoclustern (2-20 TZR) angeordnet, welche bei Aktivierung größer werden (Microcluster) und mit dem Kostimulator CD28, der Tyrosinkinase Lck und Zap70, der Serinkinase (PKC, Proteinkinase C), und Adaptermolekülen (LAT, SLP76) assoziieren, sodass Signalmoleküle in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und eine Signalkaskade initiiert wird. Anschließend bewegen sich die TZR Microcluster Richtung cSMAC, entlassen jedoch die Signalmoleküle, wodurch diese in der Peripherie verbleiben. Es wird vermutet, dass die cSMAC Region wichtig für die Deaktivierung der T-Zellen ist, denn dort finden sich Moleküle wie Cbl-b, eine Ubiquitin Ligase und LBPA (lysobisphosphatidic acid), welche Degradierung und Internalisierung bewirken (zusammengefasst in (Alarcon, Mestre et al. 2011)).

Unabhängig von verschiedenen räumlichen Modellen der Anordnung der Aktivierungsrezeptoren einer T-Zell Antwort benötigt eine T-Zelle 2 (bzw. 3, Signal 3 entspricht dem Zytokin – Umfeld) wichtige Signale zur Aktivierung. Signal 1 wird durch die Interaktion des TZR mit den MHC-Molekülen der APC gegeben. Bei Aktivierung des TZR werden ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) an der ζ -Untereinheit durch Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) phosphoryliert. Lck selbst wird durch die CD45 Tyrosin Phosphatase aktiviert. Phosphorylierte ITAMs der ζ -Untereinheiten ermöglichen die Interaktion mit Zap-70, welches ebenfalls durch Lck phosphoryliert wird und dann wiederum ein weiteres transmembranes Protein LAT (linker of activated T cells) phosphoryliert. LAT dient als Andockstelle für weitere Proteine des Signalweges, sodass über die Spaltung von PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in DAG (Diazylglyzerin) und IP₃ (Inositol-1, 4, 5-triphosphat) durch PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Kinase) die Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird und Ca²⁺-Ionen ins Cytosol freigesetzt werden. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert, welcher zusammen mit NF- κ B (freigesetzt durch Phosphorylierung von I κ B) und aktiviertem AP-1 die Transkription der IL-2 Gene verstärken.

Jedoch führt dieses Signal alleine nicht zu einer Aktivierung der T-Zelle, sondern vielmehr zu Anergie. Nur durch Integration des Signals 2, gegeben durch die Interaktion des Kostimulators CD28 mit B7.1/7.2 (CD80/86) auf der APC wird ein T-Lymphozyt voll aktiviert. Der CD28 Rezeptor selbst besitzt keine intrinsische katalytische Aktivität, jedoch eine wichtige Aminosäuresequenz, die YMNIM Abfolge. Bei Vernetzung der CD28 Rezeptoren wird dieses Motiv phosphoryliert, sodass daran vermehrt die p85 Untereinheit der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinasen) gebunden wird. Je nach Kinase-Unterklasse werden so verschiedene Signale ausgelöst, welche die T-Zellaktivierung verstärken. Zum einem werden durch diese Signale die mRNA von Zytokinen stabilisiert und die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie NFAT und NF- κ B verstärkt. Weiterhin werden Überlebenssignale über NF κ B und Bcl-X_L ausgelöst, welche Aktivierungs-induziertem Zelltod (AICD) entgegenwirken oder durch Rekrutierung weiterer Proteine den Umbau des Aktinzytoskeletts unterstützen. Eine weitere regulierende Region des CD28 Moleküls liegt weiter distal und besitzt prolinreiche Motive. Hier werden Filamin A, Lck und Grb2 rekrutiert und durch diese Moleküle die Stabilisierung der Zytokin mRNA und der Umbau des Zytoskeletts beeinflusst (zusammengefasst in (Boomer and Green 2010)).

Lange wurde diskutiert, inwiefern CD28 eigenständige Signale produziert oder lediglich die Signale des TZR verstärkt. Eindeutig ist lediglich, dass CD28 Signale alleine T-Zellen nicht aktivieren können, abgesehen von Stimulationssignalen durch superagonistische monoklonale Antikörper (Tacke, Hanke et al. 1997), welche CD28 an bestimmten lateralen Peptidsequenzen binden, die CD28 Moleküle bivalent vernetzen und so in Abwesenheit regulärer TZR Stimulation T-Lymphozyten stimulieren (Luhder, Huang et al. 2003, Evans, Esnouf et al. 2005, Dennehy, Elias et al. 2006). Gänzlich verzichten auf TZR Signale können Superagonisten jedoch nicht, denn sie verstärken schwache, antigenunspezifische TZR/MHC Wechselwirkungen, sog. tonische Signale (Dennehy, Elias et al. 2007, Levin, Zhang et al. 2008, Romer, Berr et al. 2011).

1.4 Kostimulatorische Signale in primärer und sekundärer Immunantwort

Nachdem ausführlich auf die Entstehung von Gedächtniszellen und die Aktivierung von T-Zellen im Allgemeinen eingegangen wurde, soll in diesem Abschnitt die Kernthematik der Doktorarbeit, die Abhängigkeit der CD8 T-Zell-Gedächtnisreaktionen von Kostimulation, dargestellt werden.

Seit der Entdeckung des Kostimulators im Jahre 1984 (Gmunder and Lesslauer 1984) und der Generierung von CD28 knockout Mäusen (Shahinian, Pfeffer et al. 1993) wurde der Einfluss der CD28 vermittelten Kostimulation auf Immunantworten ausführlich untersucht. Weitere Entwicklungen, wie CD80/86 knockout Mäuse, CTLA4 transgene Mäuse (diese exprimieren eine lösliche Form des CTLA-4 Moleküls, welches CD80/86 blockiert) oder blockierende Substanzen (anti-CD28 Antikörper oder Fab Fragment, CTLA4-Ig), die eine Unterbindung der kostimulatorischen Signale erlauben, schafften eine methodische Vielfalt, die erlaubte, den Einfluss der Kostimulation in verschiedenen Fragestellungen zu analysieren. In Tabelle 1 ist eine Zusammenfassung der Veröffentlichungen zu sehen, die sich vor allem mit der Frage des Einflusses von CD28 auf CD8-vermittelte Immunreaktionen beschäftigen. Die Publikationen sind chronologisch sortiert, wobei zu jeder Veröffentlichung die Hauptmethodik sowie eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse aufgeführt ist. Die letzten zwei Spalten dienen einem groben Überblick über die mit dem entsprechenden Datensatz ermittelte Bedeutung der Kostimulation für die Primär- bzw. Gedächtnisantwort. Leere Zellen weisen darauf hin, dass nur naive oder Gedächtniszellen untersucht wurden.

Durch Analyse der letzten beiden Spalten lässt sich die historische Entwicklung bezüglich des wissenschaftlichen Kenntnisstandes zur Abhängigkeit der CD8 T-Zell Reaktionen von Kostimulation erkennen. Ging man anfangs davon aus, dass Reaktionen naiver CD8 T-Zellen ohne kostimulatorische Signale stattfinden können (Shahinian, Pfeffer et al. 1993, Viola and Lanzavecchia 1996), so wandelte sich die wissenschaftliche Meinung schnell in Richtung der Abhängigkeit der Primärreaktionen von CD28 (Krummel, Sullivan et al. 1996, Lezzi, Karjalainen et al. 1998, Lumsden, Roberts et al. 2000), wohingegen Gedächtnisreaktionen lange als CD28 unabhängig angenommen wurden (Flynn and Mullbacher 1996, Kim, Schluns et al. 1999, London, Lodge et al. 2000, Suresh, Whitmire et al.

2001). Bei der Bekämpfung viraler Infektionen spielen CD8 T-Zellen eine wichtige Rolle und daher wurden in vielen Studien virale Infektionssysteme als Modell verwendet. So wurde mit VSV, MHV-68 oder Influenza A Virus gearbeitet und deutlich gemacht, dass bei primären Immunreaktionen CD28 notwendig ist (McAdam, Farkash et al. 2000, Bertram, Lau et al. 2002, Halstead and Bernhardt 2002, Fuse, Obar et al. 2006). Auch Lumsden et al. (Lumsden, Roberts et al. 2000) verwendeten Influenza A Virus Infektionen und zeigten, dass mit CTLA4-Ig blockierte Immunreaktionen sowohl bezüglich CD4- als auch CD8-Reaktionen eingeschränkt ablaufen. Es wurden weniger virusspezifische Antikörper und weniger IFN- γ produziert und zusätzlich wurde das Virus nur eingeschränkt beseitigt. Auch Studien in CD28 knockout Mäusen (Mittrucker, Kursar et al. 2001, Suresh, Whitmire et al. 2001, Bertram, Lau et al. 2002, Halstead and Bernhardt 2002) mit Influenzavirus A Infektionen oder Listerien offenbarten reduzierte primäre Immunantworten. Hingegen lieferten Studien mit LCMV robuste, wenn auch prozentual leicht reduzierte primäre Immunantworten in CD28 knockout Mäusen (Kundig, Shahinian et al. 1996) und führten erneut zu der Schlussfolgerung, dass Kostimulation nicht zwingend für die Aktivierung naiver CD8 Lymphozyten benötigt wird. Da LCMV als einziges virales Modellsystem auch natürlicherweise in der Maus vorkommt, kann sich das Virus dort besonders gut replizieren sodass es zu einer optimalen und andauernden Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung kommt. Da andauernde T-Zell Stimulation zu einer CD28 unabhängigen Aktivierung führen kann (Kundig, Shahinian et al. 1996, Viola and Lanzavecchia 1996), lässt sich die effektive T-Zellaktivierung in Abwesenheit von Kostimulation im LCMV System erklären. Im letzten Jahrzehnt wurde somit die Einsicht, dass CD28 für die Aktivierung naiver T-Zellen vonnöten ist, weithin vertreten, jedoch blieb die Bedeutung der Kostimulation für Gedächtnisreaktionen bis heute umstritten.

Autor, Jahr, Titel:	Methoden	Kurzfassung der Ergebnisse	CD28 benötigt	
			Primär	Sekundär
Shahinian et al., 1993: Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice	CD28 knockout Mäuse Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV)	Abwesenheit von CD28 führt zu reduzierter IL-2 Produktion, verminderter CD4 T-Zell Hilfe, aber nicht zur Reduktion der Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen, Beseitigung des Virus vergleichbar mit CD28 suffizienten Tieren	-	
Croft et al., 1994: Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells	<i>In vitro</i> Reaktivierung der Gedächtniszellen mit verschiedenen APCs	CD4 Gedächtniszellen lassen sich unabhängig von CD28 reaktivieren		-
Flynn et al., 1996: Memory alloreactive cytotoxic T cells do not require costimulation for activation <i>in vitro</i>	<i>In vivo</i> Gedächtnisgenerierung mit Vaccinia Virus (VV) <i>In vitro</i> Gedächtnisreaktivierung	Geprierte CD8 Gedächtniszellen sind bei <i>in vitro</i> Reaktivierung nicht auf CD2 Signale angewiesen		-
Krummel et al., 1996: Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Anti-CD28 Fab Fragmente und Antikörper (Klon 37.51) Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) Superantigen	Anti-CD28 Injektionen reduzieren die Population antigenspezifischer T-Zellen	+	
Kundig et al., 1996: Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells	CD28 knockout Mäuse LCMV und VSV Infektion	Durch lange Stimulation des TZR (vgl. LCMV Infektion) kann die Abhängigkeit der T-Zell-Aktivierung von Kostimulation umgangen werden	-	
Viola et al., 1996: T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds	<i>In vitro</i> Stimulationen	Kostimulation minimiert den Schwellenwert der Aktivierung des TZR, der zur Aktivierung der T-Zellen führt	-	
Lezzi et al., 1998: The duration of antigenic stimulation determines the fate of naïve and effector T cells	<i>In vitro</i> Stimulationsexperimente	Kostimulation setzt die Stimulationsdauer zur vollen Aktivierung einer T-Zelle herab	+	
Kim et al., 1999: Induction and visualization of mucosal memory CD8 T cells following systemic virus infection	VSV-OVA Infektion, Blockade mit CTLA4-Ig, Füttern von OVA zur Reaktivierung des Gedächtnisses	CD8 Gedächtniszellen der Darmschleimhaut können in Abwesenheit von Kostimulation voll reaktiviert werden		-
London et al., 2000: Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells	CD80/86 knockout Mäuse <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Restimulationsexperimente	CD4 Gedächtniszellen benötigen für die Reaktivierung geringere Schwellenwerte bezüglich TZR und CD28 Stimulation als naive CD4 T-Zellen		-
Lumsden et al., 2000: Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection	Blockade von CD80/86 mit CTLA4-Ig Influenza Virus	Beeinträchtigung der primären Immunantwort der cytotoxischen Lymphozyten, verspätete Beseitigung der Infektion	+	
McAdam et al., 2000: B7 Costimulation Is Critical for Antibody Class Switching and CD8+ Cytotoxic T-Lymphocyte Generation in the Host Response to Vesicular Stomatitis Virus	CD80/86 knockout Mäuse vesicular stomatitis Virus (VSV)	CD28 ist bei primären und sekundären Immunantworten für optimale cytotoxische T-Zellantworten vonnöten	+	+
Mittrücker et al., 2001: Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with <i>Listeria monocytogenes</i>	CD28 knockout Mäuse Listerieninfektion	In Knockout Mäusen ist die Primärantwort stark eingeschränkt, Gedächtnisreaktivierung verläuft mit eingeschränkter Population, welche aber bezüglich Effektorfunktionen nicht beeinflusst ist	+	+/-

Autor, Jahr, Titel:	Methoden	Kurzfassung der Ergebnisse	CD28 benötigt	
			Primär	Sekundär
Suresh et al., 2001: Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory	CD28 knockout Mäuse Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV)	Allgemein eingeschränkte Expansion antigenspezifischer CD8 T-Zellen ohne CD28, unabhängig von der Dominanz der Epitope, CD28 nicht notwendig für die Erhaltung von Gedächtniszellen	+	-
Bertram et al., 2002: Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection	CD28 knockout Mäuse Influenza Virus	Primäre Expansion antigenspezifischer CD8 Lymphozyten sind ohne CD28 extrem eingeschränkt, ebenso sekundäre Immunreaktionen in CD28 knockout Mäusen	+	+
Halstead et al., 2002: <i>In vivo</i> stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses	CD28 knockout Mäuse Influenza Virus CD137 Stimulation	Die Expansion naiver CD8 Lymphozyten mit sowohl dominanten als auch untergeordneten zugehörigen Antigen ist in CD28 knockout Mäusen stark eingeschränkt, kann durch Stimulierung von CD137 aufgehoben werden	+	
Fuse et al., 2006: CD80 and CD86 control antiviral CD8+ T-cell function and immune surveillance of murine gammaherpesvirus 68	CD80/86 knockout Mäuse murines Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)	CD28 ist bei primären CD8 Immunantworten vonnöten	+	
Ndejemi et al., 2006: Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway	CTLA4-Ig Influenza A Virus	Ohne Kostimulation sind Gedächtnis CD4 T-Zellen bezüglich Proliferation und Differenzierung eingeschränkt	+	+
Borowski et al., 2007: Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation	Anti-CD28 Antikörper (GK1.5), CD80/86 knockout Mäuse Influenza A und Herpes simplex Virus (HSV) Infektionen	CD8 Gedächtniszellen benötigen CD28 vermittelte Kostimulation für vollwertige Gedächtnisreaktionen bezüglich Proliferation und Effektorfunktionen		+
Fuse et al., 2008: Control of memory CD8+ T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response	CD28 und CD80/86 knockout Mäuse Vaccinia Virus (VV) Infektionen murines Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)	In akuten und persistenten viralen Infektionen ist CD28 für optimale CD8 Gedächtnisreaktionen vonnöten, ebenso für die Entwicklung der CD8 Gedächtniszellen. Defizite in der Sekundärantwort können durch IL-2 behoben werden	+	+
Grujic , et al., 2010: The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8+ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus	CD28 und CD80/86 knockout Mäuse LCMV Infektionen (Stämme, die akute und persistierende Infektionen auslösen)	Kostimulation ist notwendig für das Induzieren spezieller CD8 T-Zellantworten sowie für die Ausbildung und Erhaltung des Gedächtnisses	+	+/-
Arens et al., 2011: Differential B7-CD28 costimulatory requirements for stable and inflationary mouse cytomegalovirus-specific memory CD8 T cell populations	CD28 knockout, CD80/86 knockout Mäuse Anti CD80/86 Antikörper MCMV Infektion	CD8 Lymphozyten verschiedener Epitope bilden ohne Kostimulation weniger große Effektorpoole, sind jedoch funktionell nicht eingeschränkt. Ohne Kostimulation bilden sich stabile Gedächtnispopulationen	+	+/-
Eberlein et al., 2012: Multiple layers of CD80/86-dependent costimulatory activity regulate primary, memory, and secondary lymphocytic choriomeningitis virus-specific T cell immunity	CD28 knockout, CD80/86 knockout Mäuse LCMV Infektion	Ohne Kostimulation laufen CD4 und CD8 T-Zell Reaktionen eingeschränkt bezüglich Expansion, Phänotyp und Funktionalität ab. Auch Bildung und Abruf von CD8 Gedächtniszellen wird beeinträchtigt.	+	+

Autor, Jahr, Titel:	Methoden	Kurzfassung der Ergebnisse	CD28 benötigt	
			Primär	Sekundär
Gogishvili et al., 2012: Interruption of CD28-mediated costimulation during allergen challenge protects mice from allergic airway disease	Induzierbare CD28 knockout Mäuse Modell allergisches Asthma	TH2 vermittelte allergische Reaktionen verlaufen milder, wenn CD28 vor erneutem Antigenkontakt eliminiert wurde		+
Seah et al., 2012: Unlike CD4+ T-cell help, CD28 costimulation is necessary for effective primary CD8+ T-cell influenza-specific immunity	CTLA4Ig Tg Mäuse Influenza Virus Infektion	CD28 Kostimulation ist absolut notwendig für effektives Priming von naiven CD8 Zellen	+	
Linterman et al., 2014: CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection	CD4 flox/flox mit Ox40Cre verkreuzt, CD28 nach T-Zell Aktivierung	CD28 nicht nur für Aktivierung, sondern auch für CD4 T-Zell Differenzierung in TH1 und TFH-Zellen vonnöten	+	
Ndlovu et al., 2014: Inducible deletion of CD28 prior to secondary <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> infection impairs worm expulsion and recall of protective memory CD4(+) T cell responses	Induzierbare CD28 knockout Mäuse CD28 knockout Mäuse <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> Infektion	Wurmausscheidung und CD4 T-Zellantwort laufen eingeschränkt ab, sowohl bei Erst- und Zweitinfektion, wenn CD28 Signale ausbleiben	+	+
Hasegawa et al., 2017: Direct suppression of autoaggressive CD8+ T cells with CD80/86 blockade in CD8+ T cell mediated polymyositis models of mice	CTLA4-Ig, anti CD80/86 Antikörper C-Protein induzierte Myositis (CIM)	Durch Unterdrückung kostimulatorischer Signale können Autoimmunreaktionen reaktiver CD8 T-Zellen unterdrückt werden, auch unabhängig von CD4 T-Zell Hilfe		+

Tabelle 1: Zusammenstellung der Veröffentlichungen, die den Einfluss von Kostimulation auf primäre und sekundäre Immunreaktionen von CD8 T-Lymphozyten (teilweise auch CD4 T-Lymphozyten) in verschiedenen Infektionsmodellen und CD28 Interventionsmethoden untersucht haben.

Kim et al. (Kim, Schluns et al. 1999) zeigten, dass transferierte OVA-spezifische OT-I Gedächtniszellen, welche primär durch VSV-Ova Infektion aktiviert wurden, bei Reaktivierung durch orale OVA-Gabe unabhängig von CTLA4-Ig Behandlung reaktiviert werden können und brachten somit den Nachweis, dass periphere Gedächtniszellen *in vivo* unabhängig von CD28 Signalen funktionieren. Auch einige *in vitro* Experimente stützten die These der Unabhängigkeit der Gedächtniszellen von Kostimulation (Croft, Bradley et al. 1994, Flynn and Mullbacher 1996, London, Lodge et al. 2000).

Neuere Studien haben diese lang vertretene Tatsache jedoch ins Wanken gebracht (McAdam, Farkash et al. 2000, Mittrucker, Kursar et al. 2001, Bertram, Lau et al. 2002, Ndejemi, Teijaro et al. 2006, Borowski, Boesteanu et al. 2007, Fuse, Zhang et al. 2008, Eberlein, Davenport et al. 2012, Gogishvili, Luhder et al. 2012, Ndlovu, Darby et al. 2014, Hasegawa, Kawahata et al. 2017). Die durchgeführten Experimente waren den älteren Studien vor allem darin überlegen,

dass Gedächtniszellen in CD28 suffizienter Umgebung generiert wurden und akute *in vivo* Infektionen untersucht werden konnten. Beispielsweise führten Borowski et al. (Borowski, Boesteanu et al. 2007) Erstinfektionen (Influenza Typ A oder HSV-1) in wildtypischen Mäusen durch und unterbanden nur während der Sekundärinfektion kostimulatorische Signale durch Antikörper Blockade (anti-CD28) oder Transfer der Gedächtniszellen in CD80/86 knockout Tiere. Damit konnten sie zeigen, dass die Reexpansion der Gedächtniszellen um das Dreifache (bis Neunfache, je nach Infektionstyp und Blockadetyp) reduziert wird, wenn CD28 blockiert ist, dass zudem die Effektorfunktionen starken Einschränkungen unterliegen und dass das Virus weniger gut beseitigt wird.

Eberlein et al. (Eberlein, Davenport et al. 2012) widerlegten mit der Studie aus dem Jahre 2012 die Unabhängigkeit der Immunantworten von CD28 im LCMV-Infektionsmodell. Sie zeigten durch detaillierte Analysemethoden, dass LCMV-spezifische T-Zell Immunität klar von CD28-CD80/86 vermittelten Signalen gesteuert wird – insbesondere bei primären und sekundären Immunreaktionen sowie bei der Bildung des Gedächtnisses. Auch wenn CD8 Zellen bei Erstinfektion ohne Kostimulation wildtypähnliche Proliferationsmuster zeigen, so ist der Phänotyp aktivierter CD8 Lymphozyten bezüglich Aktivierungsmarker (CD44+, CD62L-, CD127-) wenig ausgereift. Bei der Sekundärinfektion führen ausbleibende kostimulatorische Signale zu reduzierter Proliferation antigenspezifischer CD8 T-Zellen mit einem, wie bei der Primärinfektion, nicht ausgereiften Phänotyp. Zusammenfassend kann also eindeutig die Wichtigkeit von CD28 vermittelter Kostimulation für intakte primäre sowie Gedächtnisreaktionen betont werden, jedoch blieb die zellintrinsic Bedeutung von CD28 für die Gedächtnisreaktion aufgrund der angewandten Methoden noch offen.

1.5 Methodik der Deletion und Blockade von CD28

Trotz der Vielzahl an überzeugenden Datensätze, die zeigen, dass CD28 für CD8 vermittelte Immunreaktionen vonnöten ist, wurde diese Doktorarbeit mit der Fragestellung nach der zellintrinsic Rolle von CD28 für CD8 Gedächtniszellen angefertigt. Die Begründung dafür liegt in der Überlegenheit der verwendeten Methoden gegenüber allen bisherigen Vorgehensweisen. Diese werden im folgenden Abschnitt erläutert, sowie die Vorteile der neuen Methodik dargestellt.

In Experimenten mit genetischen knockout Modellen wie CD28 knockout oder CD80/86 knockout Tieren (London, Lodge et al. 2000, McAdam, Farkash et al. 2000, Mittrucker, Kursar et al. 2001, Suresh, Whitmire et al. 2001, Arens, Loewendorf et al. 2011) kommt es durch die Plastizität des Immunsystems zu Anpassungen an den defizienten Phänotyp schon während der thymischen Selektion. Auch wenn durch Transfer der Zellen dieser Knockout Mäuse in einen kostimulationsintakten Organismus (Arens, Loewendorf et al. 2011, Eberlein, Davenport et al. 2012) Interaktionen mit intakten CD4-Helfer- und regulatorische T-Zellen ermöglicht werden, kam es dennoch zu Anpassungen der transferierten deletierten Zellen während deren kostimulationsloser, thymischer Selektion. Da sich das Immunsystem an Defizite anpasst, reagieren die Zellen aus systemischen knockout Mäusen in CD28 suffizienten Systemen anders als T-Zellen, die in der Anwesenheit von CD28 herangereift sind.

Bei Deletion oder Blockade der Liganden für CD28, also CD80/86 (Lumsden, Roberts et al. 2000, McAdam, Farkash et al. 2000, Grujic, Bartholdy et al. 2010), werden nicht nur kostimulatorische Signale unterbunden, sondern auch die Interaktion mit weiteren Liganden. CTLA4 ist ein wichtiger immunregulatorischer Rezeptor, der CD80/86 bivalent bindet – somit deutlich stärker als CD28 – und inhibitorische Signale ins Zellinnere leitet (Collins, Brodie et al. 2002). Bei Blockade oder Deletion von CD80/86 unterbleiben die CTLA-4 abhängigen immunregulatorischen Mechanismen, was zu einer Missinterpretation der Ergebnisse führen kann. Neben CTLA4 interagiert auch PD-L1 mit den Liganden für CD28, das sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte auf die CD8 T-Zell Antwort ausüben kann (Seo, Jeong et al. 2008). So wird durch Behinderung von CD80/86 nicht nur die Signalgebung durch CD28 verhindert, sondern eine weitere T-Zell-steuernde Einheit blockiert. Um ausschließlich den Einfluss ausbleibender Kostimulation zu untersuchen, muss also direkt das CD28 Molekül und nicht dessen Liganden adressiert werden. Dafür bieten sich CD28 blockierende Antikörper an, welche zu einem gewünschten Zeitpunkt appliziert werden können und so transient kostimulatorische Signale unterbinden. Lange wurde der Hamster anti-Maus-CD28 Antikörper Klon 37.51 verwendet (Krummel, Sullivan et al. 1996, Perrin, June et al. 1999, Yu, Albert et al. 2004), welcher jedoch nicht komplett die Interaktion von CD28 mit seinen Liganden unterbindet (Beyersdorf, Ding et al. 2008). Somit kann durch Applikation dieses anti-CD28

Klons keine komplette Blockade der Signalgebung des CD28 Moleküls erreicht werden. In meinem Institut wurde jedoch ein monoklonaler anti-Maus-CD28 Antikörper (Klon E18) entwickelt, welcher weder eine Interaktion mit Liganden zulässt noch modulierend wirkt (Beyersdorf, Ding et al. 2008). Bei Verwendung dieses Klons werden keine neutralisierenden Antikörper gegen ihn im Empfängertier produziert, da E18 in Mäusen hergestellt wurde und somit kein Fremdpeptid darstellt. Der Antikörper wurde in dieser Doktorarbeit erstmals in Infektionsexperimenten zur Analyse der Bedeutung von CD28 für CD8 vermittelte T-Zellgedächtnisreaktionen verwendet.

Eine zweite elegante Möglichkeit, die Kostimulation zu unterbinden, bietet die geflochte CD28 Mauslinie CD28^{flox/flox} (Gogishvili, Luhder et al. 2012). In dieser sind das Exon 2 und 3 des CD28 Gens von loxp Stellen flankiert. In Anwesenheit einer aktiven Cre Rekombinase werden diese Stellen herausgeschnitten, sodass kein funktionelles CD28 Molekül mehr synthetisiert werden kann. Diese geflochte CD28 Linie wurde mit der Rosa26CreER(T2) Linie (Seibler, Zevnik et al. 2003) verkreuzt (Cd28^{flox/-} Cre^{+/-}, iCD28ko). Behandelt man Tiere dieser Linie mit dem Östrogenanalog Tamoxifen, wird die induzierbare Cre Rekombinase (fusioniert an einen Östrogenrezeptor) in den Zellkern transloziert und das CD28 Gen zerstört. Somit kann CD28 zu einem bestimmten, gewünschten Zeitpunkt deletiert werden, z.B. vor Abruf des immunologischen Gedächtnisses.

Weitere Verkreuzungen dieser Linie mit OT-I Thy1.1 Linien führte zu Mäusen, deren CD8 T-Zellen deletierbar bezüglich CD28 sind sowie einen T-Zell-Rezeptor spezifisch für das Peptidantigen SIINFEKL des Ovalbuminproteins exprimieren. Zudem sind die CD8 Lymphozyten mit dem kongenen Marker Thy1.1 gekennzeichnet, womit sie in Transferexperimenten durch FACS Färbung identifiziert werden können. Diese OT-I Thy1.1 iCD8ko Linie bietet also die Möglichkeit, CD28 zu einem gewünschten Zeitpunkt nur in einer bestimmten, transferierten Zellpopulation zu deletieren und diese Zellpopulation in Konkurrenz mit CD28 suffizienten Zellen der Empfängermaus zu untersuchen.

Um Gedächtnisreaktionen zu analysieren, wurde mit dem Modellorganismus *Listeria monocytogenes* gearbeitet. Dieser intrazelluläre Erreger verursacht eine starke Aktivierung der CD8 vermittelten Immunantwort, welche sich in starker Proliferation und Zytokinsekretion der CD8 T-Lymphozyten äußert (Mittrucker,

Kursar et al. 2001). Bei natürlicher, oraler Infektion des Menschen mit Listerien durchwandert der Erreger den Gastrointestinaltrakt, bindet mit dem Oberflächenrezeptor Internalin an E-Cadherin an Darmepithelzellen und wird in die Zellen aufgenommen. Die Bakterien gelangen weiter über den Blutkreislauf in Organe wie Leber und Milz, wo sie von Makrophagen phagozytiert werden. Da das murine E-Cadherin nicht von Internalin erkannt wird, können Listerien nicht in das murine Darmepithel eindringen, sodass eine Infektion erschwert ist (Lecuit, Vandormael-Pournin et al. 2001). Daher wird im Tierversuch intravenös infiziert. Die Erreger gelangen so direkt über den Blutkreislauf in Milz und Leber und bedingen dort eine starke Immunreaktion. Die Milz bietet sich somit für die Analyse der Immunantworten an und wurde in dieser Arbeit hauptsächlich analysiert. Zusätzlich wurden Leber zur Ermittlung der Bakterienbelastung sowie Mesenteriallymphknoten und PBMCs zur immunologischen Analyse verwendet.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die unterschiedlichen Methoden CD28 vermittelte Kostimulation zu unterbinden, die in unserem Institut entwickelt wurden, bieten sich für eine Analyse der Bedeutung von CD28 in den unterschiedlichsten Fragestellungen an. So zeigten Gogishvili et al., dass CD28 Deletion zu einer mildereren Form der CD4 T_H2-vermittelten allergischen Atemwegskrankheiten führt (Gogishvili, Luhder et al. 2012). Aus der Kooperation mit der Frank Brombacher Gruppe aus Südafrika ging im Rahmen des IRTG1522 die Arbeit von Hlumani Ndlovu hervor, die die Beeinträchtigung der Immunantwort im Wurminfektionsmodell in der Abwesenheit von CD28 untersuchte. Die verlässlichen Systeme der Deletion von CD28 im induzierten CD28 knockout Modell und der Blockade mit E18 sollten in der vorliegenden Arbeit mit dem etablierten Listerien-Infektionssystem (Primärinfektion mit niedriger Dosis und Sekundärinfektion mit hoher Dosis) kombiniert werden, um die Auswirkungen fehlender Kostimulation auf Gedächtniszellen zu untersuchen. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Analyse der Expansion und Effektorfunktionen der Gedächtniszellen. Um eindeutige Ergebnisse hinsichtlich der Rolle der Kostimulation für Gedächtniszellen zu gewinnen, sollte ein Transfermodell entwickelt werden, dass die Deletion von CD28 in einer Subpopulation der Gesamt-CD8-T-Zellen ermöglicht, sowie den Vergleich CD28

suffizienter und defizienter CD8 T-Lymphozyten innerhalb eines Organismus. Mit Hilfe dieses Transfermodells sollte die Primär- und Sekundärantwort mit dem Listerieninfektionsmodell bezüglich der Abhängigkeit von Kostimulation untersucht sowie die Effektorzellen charakterisiert werden.

1.7 Erklärung zur Mitwirkung und vorrausgehende Publikationen

Diese Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Hünig am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg angefertigt. Alle Experimente wurden von mir selbst durchgeführt mit gelegentlicher technischer Unterstützung der Mitglieder der Arbeitsgruppe.

Veröffentlicht wurden Teile dieser Dissertation in den nachfolgenden Publikationen:

Fröhlich M, Gogishvili T, Langenhorst D, Lühder F, Hünig T.: Interrupting CD28 costimulation before antigen rechallenge affects CD8(+) T-cell expansion and effector functions during secondary response in mice. *Eur J Immunol.* 2016 Jul;46(7):1644-55.

Hünig T, Lühder F, Elflein K, Gogishvili T, Fröhlich M, Guler R, Cutler A, Brombacher F.: CD28 and IL-4: two heavyweights controlling the balance between immunity and inflammation. *Med Microbiol Immunol.* 2010 Aug;199(3):239-46.

2 Material

2.1 Mäuse

Mäuse der Linien C57BL/6 (J), CD28^{-/-}, OT-I Thy1.1, CD28^{flox/flox}, CD28^{-/-}Cre^{+/+} (rosa26CreER(T2)) wurden am Institut für Virologie und Immunbiologie gezüchtet. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde die Linie OT-I Thy1.1 CD28^{flox/flox} neu gezüchtet und die Linien CD28^{+/-}, CD28^{flox/-} Cre^{+/-} und OT-I Thy1.1 CD28^{flox/-} Cre^{+/-} versuchsbedingt gezüchtet. Es wurden 7-15 Wochen alte Mäuse verwendet.

2.2 Primer

CD28 PCR (Apara):

CD28 WT1: 5'-CTG CTT GTG GTA GAT AGC AAC GA-3'

CD28 WT2: 5'-CCT GAG TCC TGA TCT GTC AGA CT-3'

CD28 KO: 5'-ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCT GG-3'

FLCK PCR (Apara):

FLCK 1: CAG CTT AAA TGC ATA CAT AAG G

FLCK 2: ATT GCA GAA AAA TCT ATA GAG AC

Cre PCR (Apara):

wt 1114-1: CTC TTC CCT CGT GAT CTG CAA CTC C

wt 1114-2: CAT GTC TTT AAT CTA CCT CGA TGG

Cre 1242-1: CCA TCA TCG AAG CTT CAC TGA AG

Cre 1242-2: GGA GTT TCA ATA CCC GAG ATC ATG C

2.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Agarplatten für Listerienkultur:

29,5 g Listeria Selective Agar Base in 500 ml H₂O_{dest} → autoklavieren. Für dActA Lm-Ova: 15 µg/ml Kanamycin. Je 25 ml in Petrischale gießen.

Alsevers: 2,05 % Dextrose, 0,8 % Natriumcitrat, 0,055 % Zitronensäure, 0,42 % Natriumchlorid in H₂O_{dest}

BSS (Balanced Salt Solution I, II):

BSS I: 50 g Glukose, 3 g KH₂PO₄, 11,9 g NA₂HPO₄, 0,5 g Phenolrot ad 5 l H₂O_{dest}
BSS II: 9,25 g CaCl₂, 20 g KCl, 320 g NaCl, 10 g MgCl₂, 10 g MgSO₄ ad 5 l H₂O_{dest}
125 ml BSS I mit 125 ml BSS II mischen ad 1 l H₂O_{dest}

BSS/BSA: BSS Lösung mit 0,2 % BSA

ELISPOT Waschpuffer: 0,05 % Tween in PBS

ELISPOT Verdünnungspuffer: 1 % BSA, 0,02 % NaN₃ in PBS

FACS Puffer: 1 l PBS mit 0,1 % BSA, 0,25 g Natriumazid

Flüssigkulturmedium für Listerien:

18,5 g Brain Heart Infusion Broth in 500 ml H₂O_{dest} → autoklavieren. Für dActA Lm-Ova: 15 µg/ml Kanamycin

Fixierungspuffer: 4 % Formaldehyd in PBS

Gey's Lösung: 35 ml H₂O_{dest}, 10 ml Stock A, 2,5 ml Stock B, 2,5 ml Stock C

Stock A: 35 g NH₄Cl, 1,85 g KCl, 1,5 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,12 g KH₂PO₄, 5,0 g Glucose ad 1 l H₂O_{dest}

Stock B: 0,42 g MgCl₂ x 6 H₂O, 0,14 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,34 g CaCl₂ ad 100 ml H₂O_{dest}

Stock C: 2,25 g NaHCO₃ ad 100 ml H₂O_{dest}

PBS (Phosphat-gepufferte Saline):

80,0 g NaCl, 11,6 g Na₂HPO₄, 2,0 g KH₂PO₄, 2,0 g KCl ad 1 l H₂O_{dest}, pH auf 7,0 einstellen

TAC-Puffer: 20 mM Tris, 0,83 % NH₄Cl, pH 7,2 → autoklavieren

Tail Puffer: 50 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS in H₂O_{dest}

TAE Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure in H₂O_{dest}

Trypanblau: 0,04 % Trypanblau mit 0,05% Natriumazid in PBS

Zellkulturmedium:

RPMI 1640 Medium mit 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 50 µg/ml Gentamycin, 100 U/ml Penicillin

2.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Format
Esel anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch	PE
Hamster anti-Maus CD3e	BD Biosciences	aufgereinigt
Maus anti-Maus CD28 (E18)	Exbio Biolegend	aufgereinigt FITC
Maus anti-Maus CD90.1	BD Biosciences	PerCP, APC
Maus anti-Maus IgG1, κ	Biolegend	PE
Maus anti-Maus T-bet	Biolegend	PE
Maus anti-Ratte IgG	Jackson ImmunoResearch	Biotin
Maus IgG1 (PPV-06)	Exbio	aufgereinigt
Ratte anti-Maus B2.20	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD107a	Biolegend	FITC

Ratte anti-Maus CD11b	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD127	Biolegend	BV-421, PeCy5
Ratte anti-Maus CD25	Biolegend BD Biosciences	Pe-Cy7, PE, FITC
Ratte anti-Maus CD27	Biolegend	Pe-Cy7
Ratte anti-Maus CD4	BD Biosciences Biolegend	Alexa Flour 700, APC, FITC, PE, PerCP, APC- Cy7, Pe-Cy7
Ratte anti-Maus CD4	Exbio	aufgereinigt
Ratte anti-Maus CD4	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD44	BD Biosciences Biolegend	FITC, PE, APC-Vy7
Ratte anti-Maus CD49b	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD62L	Biolegend	FITC, PE, Alexa 700
Ratte anti-Maus CD8	BD Biosciences Biolegend	Alexa Flour 700, APC, FITC, PE, PerCP, APC- Cy7, Pe-Cy7, BV-421
Ratte anti-Maus CD8	BD Biosciences	Pacific Blue
Ratte anti-Maus CD90.2	Biolegend	Pacific Blue
Ratte anti-Maus Foxp3	eBioscience	APC
Ratte anti-Maus IFN- γ	Biolegend BD Biosciences	PE, PE-Cy7, purified, Biotin
Ratte anti-Maus IgG1, κ	Biolegend	PE; Pe-Cy7
Ratte anti-Maus KLRG-1	Biolegend	APC
Ratte anti-Maus Ter-119	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus V α 2	BD Biosciences Biolegend	PE APC-Cy7
Ziege anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch	Biotin

2.5 Magnetische Partikel und Färbereagenzien

Material	Hersteller
Streptavidin-Microbeads	Mitenyi
Strep-Tactin® PE	IBA LifeSciences
Streptavidin-Alkaline Phosphatase	Mabtech
MHC I Strep H-2 Kb SIINFEKL	IBA LifeSciences

2.6 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Dispensertips	0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, Eppendorf
Dounce Homogenisator	7 ml, 15 ml, Kleinfeld Labortechnik
Drigalski Spatel	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Einmalspritze mit Kanüle	1 ml, 26GA BD Plastipak
Einmalspritzen	1 ml, 2 ml, Braun 1 ml TBC, Dispomed
Eppendorftubes	1,5 ml, 2,0 ml, Sarstedt
FACS Röhrchen	4 ml, Greiner Bio-One 4 ml, BD Biosciences
Glaspipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml Brand
Kanülen	20G, 27G, Braun
Kryoröhrchen	1,8 ml NUNC
LS Säulen	Miltenyi Biotec
Nylonsiebe, 70 µm	Greiner Labortechnik
Pasteurpipetten (Glas)	Brand
PCR Streifen	Laborversand Hartenstein
PCR Tubes	Laborversand Hartenstein
Petrischalen	Sarstedt

Photometer Küvetten	Brand
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Brand
Plastikpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, Greiner Bio-One
Schlundsonde aus Edelstahl	Gauge 22, Fine Science Tools
Zellkulturplatte (12 Napf)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte (96 Napf)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte (96 Napf	Millipore
Filtrationsplatte, Multiscreen®-IP Sterile White Plate, 0,45 µm hydrophob)	
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Greiner Bio-One

2.7 Chemikalien und biochemische Agenzien

Substanz	Hersteller
1Kb DNA Marker	Fermentas
2-Mercaptoethanol	Sigma
Agarose low EEO	Aplichem
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Ferak
Ammoniumhydrogenphosphat-dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Roth
BCIP/NBT Liquid Substrate System	Sigma
Brain Heart Infusion Broth	Sigma
Brefeldin A	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂)	Merk
Dextrose	Roth
DNA Polymerase S mit 10x Puffer S	Genaxxon
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP solution)	Genaxxon
Ethanol 70 %	AppliChem

Ethanol, absolut	Applichem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fc Block	BD Biosciences
Formaldehyd	AppliChem
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience
Gel Red	Genaxxon
Gentamycin	Sigma
Glukose	Roth
Glutamin	Roth
GolgiStop™ (Monensin)	BD
HEPES	Roth
Isopropanol	AppliChem
Isofluran (Forene)	Abbott
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat (KHPO ₄)	Roth
Kanamycin	Sigma
Listeria Selective Agar Base	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth
Orange G	Sigma
PCR Puffer S	Genaxxon
Penicillin	Sigma
Perm/Wash Puffer 10x	BD

Phenolrot	Roth
Proteinase K	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	biomol
RPMI 1640	Gibco
SDS	Merck
SIINFEKL peptide	AnaSpec
Sonnenblumenöl	Sigma
Tamoxifen	Sigma
Tris	Roth
Trypanblau	Sigma
Tween	Sigma
Tween® 20	Roth
Zitronensäure	Roth

2.8 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav		Melag
Computer		eMAC PC
Durchflusszytometer	FACS Calibur LSR II	BD Biosciences BD Biosciences
Eismaschine		Scotsman
Elektrophorese- Spannungsquelle		Consort
ELISPOT Analysegerät	Immunospot S5 ELISPOT Analyzer	CTL
Gefrierschrank	-20 °C	Bosch

	-80 °C	Forma Scientific
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Inkubator		Heraeus Kottermann
	Certomat H	Braun
Kühlschrank	4 °C	Bosch
Magnetseparator	MidiMACS	Miltenyi
	QuadroMACS	Miltenyi
Mikroskop	Labovert FS	Leitz
	Biomed	Leitz
Multipipette		Eppendorf
PCR Maschine	Mastercycler nexus gradient	Eppendorf
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Pipetten		Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu-jet	Brand
Sterilbank		Heraeus Gelair
Vortex	Genie 2	Scientific Industries
Waage		Scaltec
Wasserbad		Lauda
Zählkammer		Neubauer
Zentrifuge	5810R	Eppendorf
	5415C	Eppendorf
	Varifuge 20 RS	Heraeus

2.9 Software

Software	Verwendung	Hersteller
Immunospot	ELISPOT Analyse	CTL
Endnote X7	Verwaltung der Referenzen	Thomson Reuters
FACSDiva Software	FACS Datenaufnahme	BD Biosciences
FlowJo 9.8.3	FACS Datenauswertung	Treestar, Inc
Prism 4	Graphiken und statistische Analyse	Graphpad Software

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA Extraktion auf Aufbereitung

Zur Genotypisierung gezüchteter Mäuse wurde eine Biopsie der Schwanzspitze oder Stanzmaterial der Ohren verwendet. Das Gewebe wurde mit 750 µl Tail-Puffer und 20 µl Proteinase K (10 µg/µl) über Nacht bei 56 °C unter leichtem Schütteln im Heizblock verdaut. Anschließend wurden die Proben mit 280 µl gesättigter NaCl Lösung versetzt, 5 min geschüttelt und 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt, für 3 min geschüttelt und 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das DNA Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde es in 50-200 µl H₂O_{dest} gelöst.

3.1.2 PCR und Gelelektrophorese

Primerverdünnungen (jeweils 0,05 mM) wurden entsprechend der Tabelle 2 für die jeweiligen PCRs angesetzt.

PCR	Primermix	Primer
CD28	CD28wt	CD28wt 1, CD28wt 2
	CD28ko	CD28ko, CD28wt 2
FLCK	FLCK	FLCK1, FLCK2
Cre	wt 1114	wt 1114-1, wt 1114-2
	Cre 1242	Cre 1242-1, Cre 1242-2

Tabelle 2: Primermix für PCRs

PCR Ansätze wurden in einem Volumen von 25µl angesetzt, bestehend aus 19,8 µl H₂O_{dest}, 2,5 µl 10x Puffer S, 0,5 µl 5 dNTPs (5 mM), 0,2 µl Taq Polymerase S und 1 µl DNA. Entsprechend Tabelle 3 wurden die PCRs im Thermocycler durchgeführt, wobei für die FLCK PCR nur ein Ansatz je Probe benötigt wird. Für die CD28 und Cre PCR sind jeweils ein Ansatz für die Wildtyp PCR, ein Ansatz für die PCR der mutierten Bande, sowie zwei getrennte Gele nötig. Die Proben wurden mit 5 µl Orange G Beladepuffer versetzt, zusammen mit einem DNA

Marker auf ein Agarose Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 130 V mit TAE Puffer durchgeführt.

PCR	CD28	FLCK	Cre
Erstdenaturierung	94 °C, 3 min	94 °C, 3 min	94 °C, 3 min
Denaturierung	94 °C, 1 min	94 °C, 1 min	94 °C, 1 min
Primerhybridisierung	52 °C, 1 min	45 °C, 1 min	62 °C, 1 min
Elongation	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min
Wiederholung	30 Zyklen	30 Zyklen	30 Zyklen
Finale Elongation	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min
Kühlung	4 °C, ∞	4 °C, ∞	4 °C, ∞
Agarose Gel:	1,5 %	1,5 %	1 %

Tabelle 3: PCR Programme

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Bakterienkultur

Es wurden Listerien der Art *Listeria monocytogenes*, die eine sekretierte Form des Ovalbumin Proteins ausscheiden, verwendet, und zwar der pathogener Stamm Lm-Ova (Pope, Kim et al. 2001) und der attenuierte, kanamycin resistente Stamm Δ ActA Lm-Ova, welchem das Aktin-akkumulierende Gen ActA entfernt wurde (Sanchez-Ruiz, Wilden et al. 2008). Bakterien dieses Stamms können Aktin nicht mehr akkumulieren und sind daher intrazellulär unbeweglich und unfähig, Nachbarzellen zu infizieren. Zur Herstellung einer Stocklösung wurde eine Übernachtskultur (50-100 ml) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Δ ActA Lm-Ova Kulturen wurden mit 15 μ g/ml Kanamycin versetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 kultiviert, anschließend geerntet (6000 rpm, 10 min, 4 °C), mit PBS gewaschen und in PBS mit 20 % Glycerin aufgenommen. Aliquots wurden in Cryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Zur Bestimmung des Titers wurde ein Aliquot aufgetaut, eine 1:10 Verdünnungsreihe in PBS hergestellt und auf Listerien selektierende Agarplatten (+ Kanamycin für Δ ActA Lm-Ova) ausplattiert.

Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert und ausgezählt, um den CFU zu bestimmen. Der Prozess wurde zur Verifizierung des CFUs wiederholt.

3.2.2 Analyse von Lebersuspensionen

Zur Bestimmung der Bakterienzahl der Leber wurde diese präpariert, in PBS aufgenommen und in Dounce-Homogenisatoren verrieben. Verdünnungsreihen der Suspension wurden auf Listerien selektive Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Durch Auszählung der Platten wurde die Bakterienbelastung der Leber ermittelt.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Züchtung der Linie OT-I Thy1.1 FLCK

Ausgangspunkt der Zucht waren die im Institut vorhandenen Linien OT-I Thy1.1 und FLCK. Homozygote Tiere dieser Linien wurden miteinander verpaart um heterozygote Tiere des Genotyps OT-I^{+/-} Thy1.1^{+/-} CD28^{flox/+} zu erhalten. Diese Nachkommen wurden untereinander und mit OT-I Thy1.1 Tieren verpaart, um Mäuse des Genotyps OT-I Thy1.1^{+/+} CD28^{flox/+} zu erhalten. Erneute Verpaarung der Nachkommen führte zur Linie OT-I Thy1.1 FLCK mit dem Genotyp OT-I Thy1.1^{+/+} CD28^{flox/flox}.

3.3.2 Versuchsbedingte Zuchten

Für Experimente, in denen CD28 global deletiert werden sollte, wurden Tiere der Linie FLCK (CD28^{flox/flox}) mit Tieren der Linie Cre.CD28ko (CD28^{-/-}Cre^{+/+}) verpaart, um Tiere des Genotyps CD28^{flox/-} Cre^{+/-} (kurz iCD28ko) zu erhalten. Für Transferexperimente mit selektiv deletierbaren OT-I Thy1.1 Zellen wurden CD28 heterozygote Empfängertiere (CD28^{+/-}) durch Kreuzung der Linien C57BL/6 (J) und CD28ko (CD28^{-/-}) gezüchtet, sowie Donortiere des Genotyps OT-I Thy1.1 CD28^{flox/-} Cre^{+/-} (kurz: OT-I Thy1.1 iCD28ko) durch Kreuzung der Linien Cre.CD28ko und OT-I Thy1.1 FLCK.

3.3.3 Genotypisierung

Alle Versuchstiere wurden auf CD28ko, gefloxtes oder wildtypisches CD28 Allel und Cre Allel per PCR untersucht. Dazu wurde Biopsiematerial wie unter Punkt 3.1.1 beschrieben verarbeitet und per PCR (siehe Punkt 3.1.2) analysiert. Zur Typisierung der Thy1.1 und OT-I Gene wurden PBMCs aus Blutproben, welche durch Punktion der Vena facialis oder der lateralen Schwanzvene gewonnen wurden, isoliert (siehe 3.4.1). Diese wurden mit den Antikörpern anti-Maus CD90.1, anti-Maus CD90.2, anti-Maus CD8 und anti-Maus Vα2 gefärbt (siehe Punkt 3.5.1.1), am FACS analysiert und in FlowJo ausgewertet.

3.3.4 Mausinfektionen

Tiere wurden durch Injektion einer bestimmten Bakterienanzahl in 100 µl PBS in die laterale Schwanzvene infiziert. Die Dosis wurde so gewählt, dass eine geringe Belastung der Mäuse sichergestellt war, jedoch eine gute Immunreaktion ablaufen konnte. Für eine Primärinfektion wurden 5000 CFU des Lm-Ova Stammes verwendet und für die Sekundärinfektion zur Reaktivierung des Gedächtnisses $1 \cdot 10^5$ CFU. Aus Sicherheitsgründen wurde im Laufe der Doktorarbeit der Erregerstamm gewechselt und der Δ ActA Lm-Ova Stamm verwendet, welcher stark attenuiert ist. Um die Immunreaktionen gegen beide Stämme gleich zu halten, wurden die Δ ActA Lm-Ova Listerien titriert. So konnten mit einer Infektion von $1 \cdot 10^6$ CFU für die Primärinfektion und mit $1 \cdot 10^7$ CFU für die Sekundärinfektion Immunreaktionen gleichen Ausmaßes erzielt werden.

3.3.5 Mausinjektionen

Um Antikörper zu applizieren, wurden diese in einem Volumen von 200 µl verdünnt und entsprechend der Versuchsbedingungen i.p. gespritzt.

3.3.6 Schlundsondierung mit Tamoxifen

Für die Deletion von CD28 in iCD28ko Mäusen und Zellen der Linie OT-I Thy1.1 iCD28ko wurde den Mäusen an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 2,5 mg Tamoxifen appliziert, um die Cre Rekombinase zu aktivieren. Um eine Tamoxifensuspension zu erstellen, wurden 100 mg Tamoxifen in 1 ml

Sonnenblumenöl und 100 µl reinst. Ethanol unter Erwärmen im Wasserbad gelöst, in 4 Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C eingefroren. Vor Verwendung wurden die Suspensionen im Wasserbad aufgetaut und mit Sonnenblumenöl auf 25 mg/ml eingestellt. Pro Maus wurden 100 µl der Tamoxifensuspension bzw. 100 µl Öl als Kontrolle appliziert.

3.3.7 Adoptiver Zelltransfer

Um CD28 selektiv nur in einer Subpopulation der CD8 Zellen deletieren zu können, wurden Transferexperimente durchgeführt. Dazu wurden Milzen von OT-I Thy1.1 iCD28ko Mäusen aufbereitet (siehe 3.4.2), die CD8 positiven Zellen wurden durch negative Isolation abgetrennt (siehe 3.4.4), zweimal in PBS gewaschen und auf die entsprechende Zellzahl eingestellt. Zellen wurden in 150 µl PBS in die laterale Schwanzvene der Empfängertiere (CD28^{+/-}) injiziert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Aufreinigung von PBMCs

Blutproben wurden durch Punktion der Vena facialis, der lateralen Schwanzvene oder aus dem retrobulbären Venenplexus nach Betäubung mit Isofluran gewonnen. Das Blut wurde in 1 ml Alsevers bis zur Weiterverarbeitung aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Zur weiteren Analyse wurden die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation bei 1600 rpm, 5 min, 4 °C, sedimentiert und mit PBS gewaschen. Nach Durchführung einer Erythrozytenlyse mit Gey's Lösung für 7 min bei 37 °C wurden die Zellen nach Zentrifugation für weitere Analysen in FACS Puffer überführt.

3.4.2 Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen

Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden Milzen bzw. Lymphknoten präpariert, in BSS/BSA aufgenommen und durch ein 70 µm Nylonsieb gerieben. Zur Erythrozytenlyse wurden Milzzellen mit 10 ml TAC Puffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal mit BSS/BSA gewaschen

(4 °C, 5 min, 1600 rpm). Lymphknotenzellen wurden einmal mit BSS/BSA gewaschen und anschließend mit einer Neubauer Zählkammer gezählt.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl lebender Zellen einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden 10 µl der Suspensionen im Verhältnis 1:10 mit einer Trypanblaulösung verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Hell leuchtende Zellen, welche den Farbstoff nicht aufnehmen, wurden als lebendige Zellen gezählt und gefärbte Zellen wurden aufgrund defekter Plasmamembranen nicht beachtet.

3.4.4 Aufreinigung CD8 positiver Milzzellen

Für die Aufreinigung von CD8 positiven Milzzellen wurde die Zellsuspension auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Pro $1 \cdot 10^8$ Zellen wurden je 1 µl der Antikörper Biotin Ratte anti-Maus Ter 119/erythroid cells (markiert Erythrozyten), Biotin Ratte anti-Maus CD4 (markiert CD4 positive T-Zellen), Biotin Ratte anti-Maus CD49b NK pan (markiert NK-Zellen), Biotin Ratte anti-Maus CD45R/B220 (markiert B-Zellen), Biotin Ratte anti-Maus CD11b (markiert Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen), Biotin Maus anti-Ratte IgG und Biotin Ziege anti-Maus IgG hinzugegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurde durch Waschen (4 °C, 5 min, 1600 rpm) entfernt. Die Zellen wurden erneut auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt und mit 50 µl pro $1 \cdot 10^8$ Zellen Streptavidin MicroBeads für 20 min bei 4 °C unter mehrmaligem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Zellsuspension auf einer LS Säule aufgetrennt, wobei die Fraktion der CD8 positiven Zellen als Durchlauf aufgefangen wurde. Per FACS Färbung wurde die Reinheit bestimmt, welche stets größer als 90 % war.

3.4.5 Zellkultivierung

3.4.5.1 Übernachtkultur für IFN-γ Sekretion

Für die Analyse IFN-γ produzierender Zellen wurden Milzzellsuspensionen auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in RPMI Medium eingestellt und in 2 ml Medium ohne bzw. mit 1 µg/ml Antigen SIINFEKL über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer 12-Napf Zellkulturplatte stimuliert. Zur Hemmung des Golgitransports wurde für 2 h mit

Brefeldin A (2 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS Röhren überführt, mit FACS Puffer gewaschen und intrazellulär gefärbt (siehe 3.5.1.3).

3.4.5.2 Übernachtkultur für IFN-γ ELISPOT

Um IFN-γ positive Zellen innerhalb der CD8 Population zu bestimmen, wurden ELISPOT Analysen durchgeführt. Dazu wurden 96-Napf Multiscreen®-IP Platten über Nacht bei Raumtemperatur mit Ratte anti-Maus IFN-γ Antikörper (6 µg/ml) beschichtet. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS wurde die Platte für 2 h bei 37 °C mit Zellkulturmedium geblockt. Pro Napf wurden in 200 µl Medium verschiedene Konzentrationen an CD8 Effektorzellen in Abwesenheit oder Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Antigens SIINFEKL stimuliert und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert.

3.4.5.3 Kultur für Degranulationsassay

Mit dem Degranulationsassay kann gleichzeitig die Degranulation und die IFN-γ Produktion antigenspezifischer Zellen analysiert werden. Dazu wurden 1*10⁶ Milzzellen in 200 µl Medium in Abwesenheit oder Anwesenheit von 1 µg/ml SIINFEKL für 5 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Ratte anti-Maus CD107a Antikörper wurde direkt zu der Kultur dazugegeben (0,5 µg/ml), um das CD107a Molekül dem Antikörper zugänglich zu machen, da es nach Degranulation der Zelle nur vorübergehend an der Zelloberfläche exponiert wird. Des Weiteren wurde Brefeldin A (0,2 µg/ml) und GolgiStop™ (2 µl/ml) hinzugegeben, um den Proteintransport an die Zelloberfläche zu unterbinden. Im Anschluss an die Kultur wurden die Zellen in FACS Röhren überführt, mit FACS Puffer gewaschen (4 °C, 5 min, 1600 rpm) und gefärbt (siehe 3.5.1.2 und 3.5.1.3).

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 FACS-Analyse (Durchflusscytometrie)

3.5.1.1 Extrazelluläre Färbung

Mit der extrazellulären Färbung werden Moleküle, die sich auf der Zelloberfläche befinden, gefärbt. Dazu wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen einer Zellsuspension bzw. PBMCs mit FACS Puffer gewaschen (4 °C, 5 min, 1600 rpm) und nach Zugabe entsprechender Antikörper in 100 µl Gesamtvolumen für 20-30 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Nach erneutem Waschen mit FACS Puffer wurden die Zellen direkt analysiert oder für eine intrazelluläre Färbung fixiert.

3.5.1.2 Streptamer Färbung

Mit der Streptamerfärbung werden Zellen gefärbt, die einen bestimmten T-Zell-Rezeptor besitzen. Dieser bindet an MHC Klasse I Moleküle der Subklasse H-2Kb, welche das Antigen SIINFEKL präsentieren.

Vor der Färbung wurden die antigenbeladenen MHC Moleküle (MHC-Streptamers) mit dem Färbereagenz Strep-Tactin®-PE für 45 min bei 4 °C inkubiert, um Färbekomplexe zu bilden. Es wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in FACS Puffer aufgenommen, zentrifugiert (4 °C, 5 min, 160 rpm) und mit den Färbekomplexen für 25 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden Antikörper für die Oberflächenfärbung hinzugegeben und weitere 20 min bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Färbeagenzien wurden durch Waschen mit FACS Puffer entfernt. Die Zellen wurden anschließend entweder direkt analysiert oder für eine intrazelluläre Färbung fixiert.

3.5.1.3 Intrazelluläre Färbung im Cytoplasma

Bei dieser Art der intrazellulären Färbung werden Antigene im Zytoplasma gefärbt. Durch Permeabilisierung der Plasmamembran gelangen Antikörper zu den Zielproteinen.

Im Anschluss an die extrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit 4 %iger Formaldehydlösung in PBS bei 4 °C für 30 min bzw. mit 2 %iger Formaldehydlösung in PBS bei 4 °C über Nacht fixiert. Nach Waschen mit FACS Puffer wurden die Zellen für 30 min durch Inkubation mit Perm Puffer (BD) bei

4 °C permeabilisiert und anschließend mit Ratte anti-Maus IFN- γ Antikörper bzw. Isotyp-Kontrolle für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit FACS Puffer entfernt und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

3.5.1.4 Intrazelluläre Färbung im Kern

Bei dieser Art der intrazellulären Färbung werden Antigene, die sich im Zellkern befinden, gefärbt. Durch Permeabilisierung der Plasmamembran und der Kernmembran gelangen Antikörper zu den Zielproteinen.

Nach Oberflächenfärbung wurden die Zellen für mind. 30 min in Fix/Perm Puffer (Foxp3 Staining Buffer Set) inkubiert, anschließend mit FACS Puffer und dann mit Perm Puffer (Foxp3 Staining Buffer Set) gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubation mit Maus anti-Maus T-bet-PE bzw. Ratte anti-Maus Foxp3-APC Antikörper bei 4 °C wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen und analysiert.

3.5.1.5 Nachweis von E18

Mit der Färbung des Antikörpers E18 auf der Zelloberfläche bzw. mit dem Nachweis des Antikörpers im Serum kann aufgezeigt werden, ob das CD28 Molekül geblockt bzw. frei auf der Zelloberfläche vorliegt bzw. ob im Serum ungebundene E18 Antikörper zirkulieren.

Für den Nachweis von E18 im Serum wurden einige Tropfen Blut aus der Vena facialis oder der lateralen Schwanzvene entnommen und bei Raumtemperatur, 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, um das Serum abzutrennen. $1 \cdot 10^6$ Lymphozyten einer C57BL/6 Maus wurden mit Fc-Block vorbehandelt (10 min, 4 °C), um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurden 10 μ l Serum zu den Zellen gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS Puffer wurden Antikörper für die Oberflächenfärbung sowie Antikörper gegen E18 (Esel anti-Maus IgG-PE) dazugegeben und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen analysiert.

Für den Nachweis von E18 auf der Zelloberfläche von PBMCs wurde Blut abgenommen, PBMCs wurden aufgereinigt (3.4.1), mit Oberflächenantikörpern sowie Esel anti-Maus IgG-PE gefärbt, gewaschen und analysiert.

3.5.2 ELISPOT

Nach der Übernachtskultur wurden die ELISPOT Platten entwickelt. Dazu wurde nach sechsmaligem Waschen mit Waschpuffer mit Ratte anti-Maus IFN- γ Biotin Zweitantikörper (1 $\mu\text{g/ml}$) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Durch Inkubation mit Streptavidin-AP (2 $\mu\text{g/ml}$) in Verdünnungspuffer (1 h bei Raumtemperatur) wurde das Färbeenzym zu IFN- γ produzierenden Zellen gebracht. Diese wurden nach erneutem Waschen durch Zugabe von BCIP/NBT Substrat sichtbar gemacht. Die Platten wurden in Dunkeln solange entwickelt, bis erste Spots sichtbar waren und durch Waschen mit Leitungswasser die Entwicklung gestoppt. Nach Trocknen der Platten wurden sie im Immunospot Plattenlesegerät eingelesen und ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der globalen Deletion oder Blockade der CD28 vermittelten Kostimulation auf die sekundäre Immunantwort von CD8 T-Zellen

Ausgangspunkt der Doktorarbeit war die Analyse des Einflusses der durch CD28 vermittelten Kostimulation auf sekundäre Immunantworten von CD8 T-Zellen. Die im Institut generierte Mauslinie CD28^{flox/flox} (Gogishvili, Luhder et al. 2012) erlaubt bei Verkreuzung mit einer Linie, die eine Cre Rekombinase trägt, eine Deletion der Exons 2 und 3 des CD28 Gens. Die von Artemis kommerziell erhältliche Linie rosa26CreER (T2) (Seibler, Zevnik et al. 2003) bietet die Möglichkeit, eine Rekombinase exprimieren zu lassen, die im Cytoplasma zurückgehalten wird, jedoch durch Gabe von Tamoxifen zu einem gewünschten Zeitpunkt aktiviert werden kann, sodass die Deletion des CD28 Gens auf einen bestimmten Zeitraum festgelegt wird. Mit Tieren des Genotyps CD28^{flox/-} ERCre^{+/-} (iCD28ko) wurde die Bedeutung des Kostimulators durch globale Deletion von CD28 untersucht. Weiterhin wurde in meinem Institut der monoklonale Maus anti-Maus CD28 Antikörper E18 entwickelt, welcher der erste anti-CD28 Antikörper ist, der *in vivo* nicht modulierend und aktivierend, sondern blockierend wirkt (Dennehy, Elias et al. 2006, Beyersdorf, Ding et al. 2008). Durch E18 Injektionen kann zu einem gewünschten Zeitpunkt CD28 blockiert und so Immunreaktionen ohne CD28 vermittelte Kostimulation untersucht werden.

4.1.1 Beeinträchtigung der Kostimulation durch globale Deletion von CD28 führt zu eingeschränkter sekundärer Immunantwort von CD8 T-Zellen

Um die Gedächtnisantwort untersuchen zu können, wurden Mäuse der Linie iCD28ko (Genotyp CD28^{flox/-} Cre^{+/-}) zunächst mit geringer Dosis an Listerien, welche das Modellantigen Ovalbumin sezernieren (LM-OVA), infiziert und nach einem Monat wurde die Gedächtnisantwort durch eine Infektion mit erhöhter Dosis abgerufen.

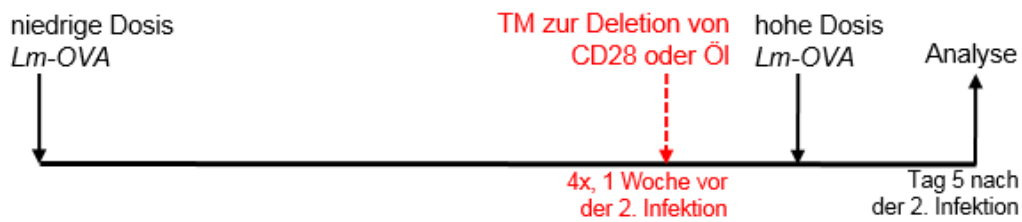


Abbildung 2: Versuchsaufbau zur globalen Deletion von CD28 vor der Sekundärantwort

Vor der Sekundärinfektion wurde CD28 durch Gabe von jeweils 2,5 mg Tamoxifen in Öl an vier aufeinanderfolgenden Tagen deletiert bzw. in Kontrollmäusen durch Gabe von reinem Öl nicht beeinflusst. Am Höchststand der Immunreaktion (Tag 5) wurden die Mäuse analysiert (Versuchsaufbau siehe Abbildung 2). Um sicher zu gehen, dass CD28 erfolgreich deletiert und von der Zelloberfläche verschwunden war, wurde in jedem Deletionsexperiment die Anwesenheit des CD28 Moleküls auf der Zelloberfläche durch Oberflächenfärbung überprüft. In den FACS Plots und im oberen Histogramm in Abbildung 3 ist das Verschwinden der CD28 Expression auf CD8 Zellen von iCD28ko Mäusen nach Tamoxifenbehandlung (oberste Reihe der Dot Plots bzw. blaue Linie) dargestellt, wohingegen mit Öl behandelte Mäuse (mittlere Reihe Dot Plots bzw. rote Linie) eine CD28 Expression ähnlich der Expression wildtypischer Mäuse (untere Reihe Dot Plots bzw. grüne Linie) zeigten. Aufgrund des heterozygoten Genotyps der kCD28 Linie liegt die Expression des CD28 Moleküls etwas unter derjenigen wildtypischer Tiere. Die Tamoxifen behandelten Tiere zeigten eine Expression vergleichbar mit CD28 knockout Tieren (unteres Histogramm), sodass von einer erfolgreichen Deletion durch die Tamoxifenbehandlung ausgegangen werden kann.

Zur Analyse der Sekundärinfektion wurden antigenspezifische T-Zellen mit Streptamerfärbung (weist TZR nach, der spezifisch SIINFEKL auf MHC Molekülen des Typs H-2Kb erkennt) und FACS Oberflächenfärbung nachgewiesen, wobei zunächst auf lebende Zellen, dann auf CD8 positive und Streptamer-positive Zellen gated wurde (Abb. 4A). Wurde bei der Sekundärantwort CD28 deletiert, so verringerte sich sowohl der Anteil antigenspezifischer Zellen innerhalb der CD8 positiven Zellen, als auch deren absolute Zellzahl pro Milz (Abb. 4B) und zwar sowohl am Tag 5 der Analyse als auch im Verlauf der Immunantwort (Abb. 4C). Der Verlauf der Infektion wurde durch Deletion von CD28 nicht beeinflusst, denn innerhalb der ersten 48 Stunden nach Infektion sank die Bakterienlast der Leber

auf ein sehr niedriges Level, sodass sie nach 3 Tagen, dem Zeitpunkt des Beginns der Expansion der Effektorzellen, unterhalb der Nachweisgrenze lag (Abb. 4D).

Kostimulation spielt somit für die Expansion der Effektorzellen eine entscheidende Rolle, da in Abwesenheit von CD28 etwa 50 % weniger Effektorzellen entstanden sind.

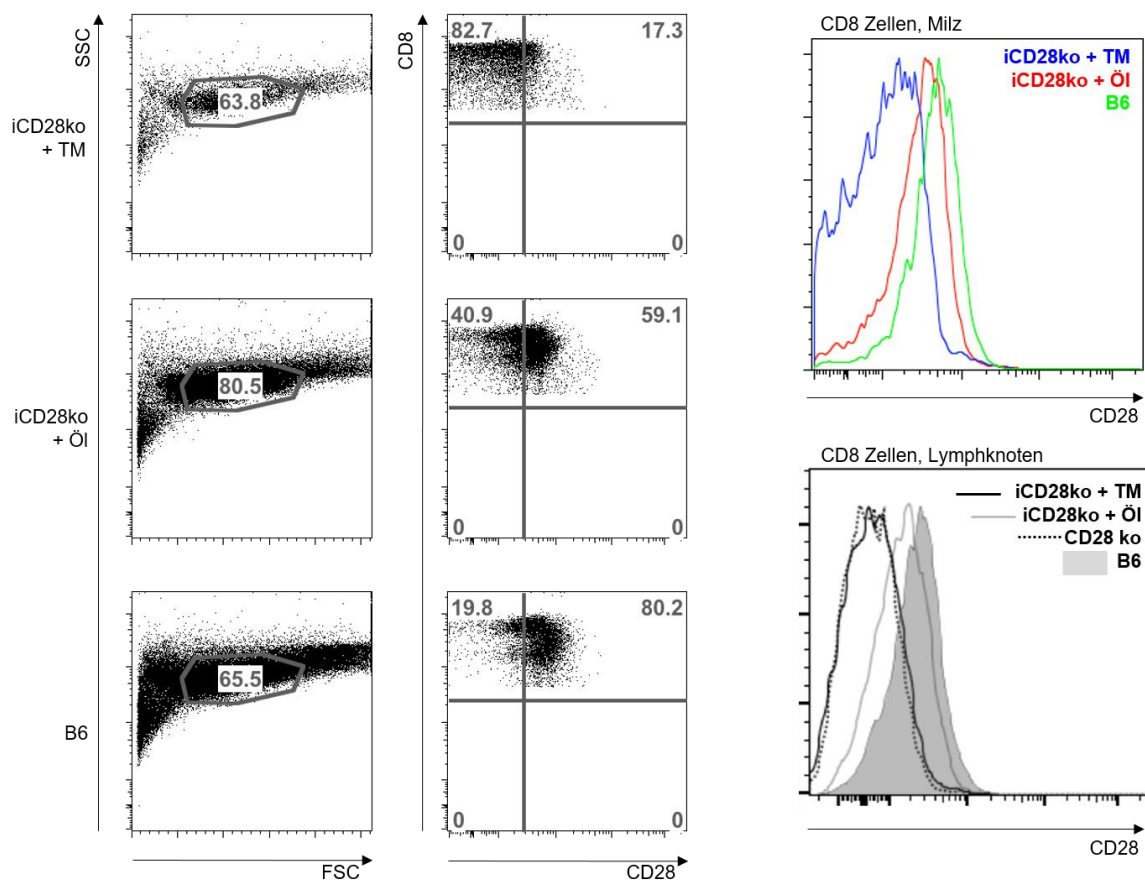


Abbildung 3: Nachweis der Deletion von CD28. Milzzellen wurden an Tag 5 nach der Sekundärinfektion mit anti-Maus CD8 und anti-Maus CD28 Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert und ausgewertet. Die Dot Plots einer CD28 deletierten (iCD28ko + TM), einer kontrollbehandelten (iCD28ko + Öl) und einer wildtypischen Maus (B6) zeigen die Gating Strategie vom FSC/SSC Gate auf die CD8 positiven Zellen und deren CD28 Expression. Das obere Histogramm zeigt die Überlagerung der CD28 Expression der CD8 Zellen dieser 3 Mäuse. Das untere Histogramm zeigt die CD28 Expression von Lymphknoten Zellen verschiedener Linien, welche nach Tamoxifen- bzw. Ölbehandlung gefärbt wurden.

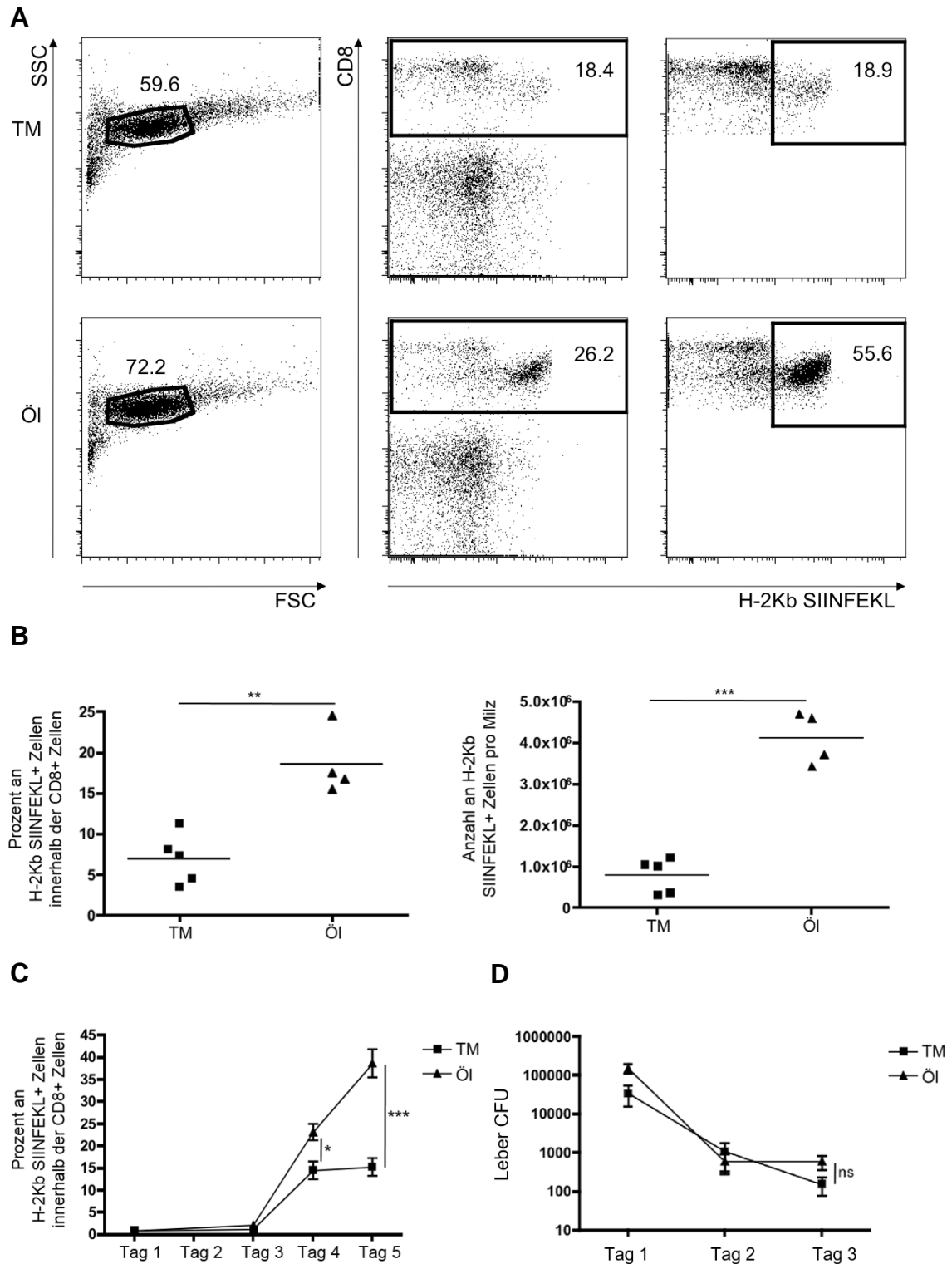


Abbildung 4: Nachweis Antigen spezifischer Effektorzellen nach Sekundärinfektion mit bzw. ohne vorheriger CD28 Deletion. (A) Gating Strategie vom Live-Gate zu CD8 positiven und Tetramer positiven (H-2Kb SIINFEKL+) Zellen für CD28 deletierte (TM) und CD28 suffiziente (ÖI) Milzzellen. (B) Prozent antigenspezifischer Zellen innerhalb CD8 positiver Milzzellen und absolute Anzahl antigenspezifischer Zellen pro Milz. (C) Prozent antigenspezifischer Zellen der CD8 Zellen der Milz im Verlauf der Infektion. (D) Kolonie-formende Einheiten (CFUs) der Leber im Verlauf der Sekundärinfektion. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Für C wurden die Daten von 8 Experimenten gepoolt, die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von 3-10 Mäusen. Für D wurden 7 Mäuse pro Zeitpunkt analysiert. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

Um die expandierten Effektorzellen auf ihre Funktionalität zu untersuchen, wurden unterschiedliche Analysen durchgeführt, die die verschiedenen Funktionen der CD8 Zellen widerspiegeln. Zum einen wurde das Ausschütten lytischer Granula untersucht, welche infizierte Zielzellen abtöten und zum anderen die Sekretion von IFN- γ , das die T_H1-vermittelte Immunantwort weiter vorantreibt und Makrophagen aktiviert. Die Produktion von IFN- γ wurde in den frühen Experimenten durch über Nacht Kulturen von Milzzellsuspensionen in der Anwesenheit des Antigens SIINFEKL untersucht. Zwei Stunden vor Analyse wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben, um den Golgi Transport zu unterbinden und das IFN- γ für die intrazelluläre Färbung zugänglich zu machen. Nach Deletion von CD28 zeigte sich eine signifikante Abnahme IFN- γ produzierender Zellen innerhalb der CD8⁺ Zellen (Abb. 5A). Da antigenspezifische Zellen innerhalb der CD8 Zellen reduziert waren (Abb.4B), konnte die absolute Reduktion der IFN- γ Produzenten nicht direkt auf Einflüsse durch die Deletion von CD28 bezogen werden, sondern musste im Verhältnis betrachtet werden. Durch Berechnung des Verhältnisses von IFN- γ Produzenten zu antigenspezifischen, H-2Kb SIINFEKL⁺ Zellen (Abb. 5A) zeigte sich, dass durch Entfernung der Kostimulation der Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen nicht beeinträchtigt wurde.

Interferon- γ produzierende Zellen konnten auch mit ELISPOT Experimenten nachgewiesen werden. Hierzu wurden Milzzellsuspensionen über Nacht auf ELISPOT Platten kultiviert, entwickelt und die Anzahl Spots pro $1 \cdot 10^6$ Zellen berechnet. Betrachtet man die Anzahl an IFN- γ produzierenden Zellen innerhalb der gesamten Milzzellen, stellt sich eine Tendenz in Richtung einer reduzierten IFN- γ Antwort nach CD28 Deletion heraus. Setzt man die entsprechenden Spots allerdings in Relation zu den antigenspezifischen CD8 T-Zellen der entsprechenden Milz, ergab sich kein Einfluss die Deletion des CD28 Gens auf den Anteil der IFN- γ Produzenten (Abb. 5B).

In den *in vitro* Restimulationsexperimenten war es bisher nicht möglich, mit Antigen stimulierte Zellen auf die Expression des H-2Kb SIINFEKL spezifischen TZR zu färben. Das FACS Signal des TZR wurde nach Antigenstimulation über Nacht sehr schwach und konnte nicht mehr vom Signal negativer Zellen getrennt werden, denn durch die Stimulation mit Antigen wird der TZR von der Zelloberfläche herunterreguliert (Lauritsen, Christensen et al. 1998).

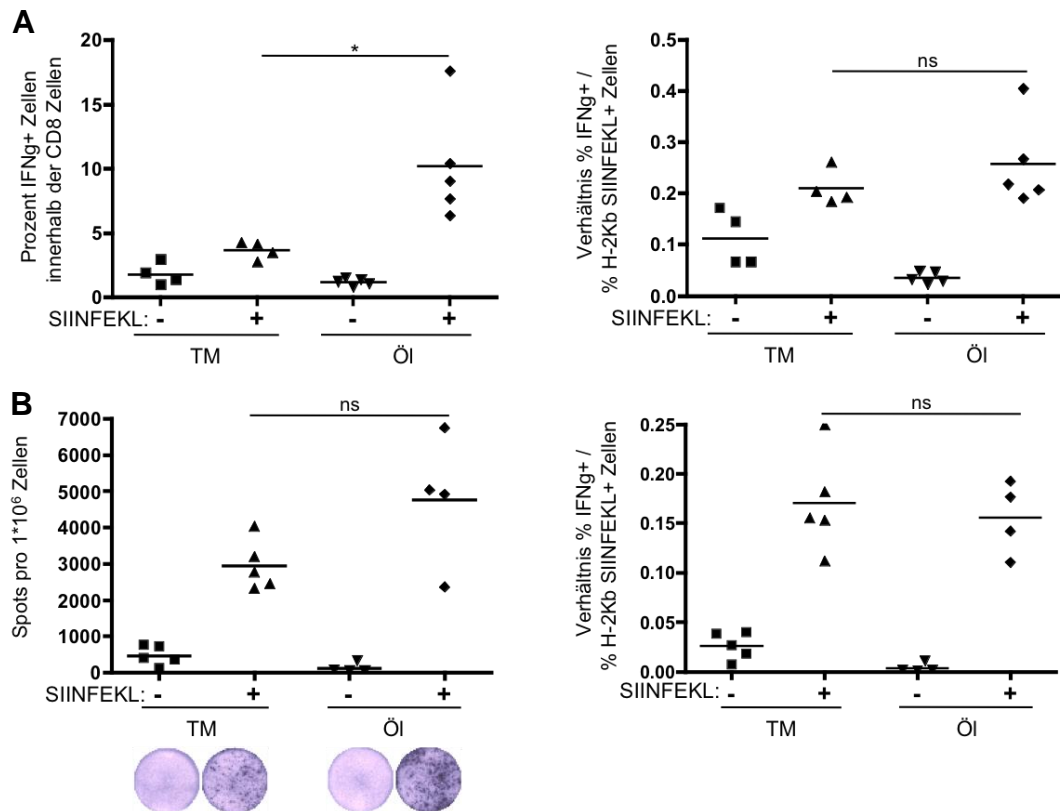


Abbildung 5: Nachweis der IFN- γ Produktion Antigen-stimulierter Milzzellen. (A) Milzzellen CD28 suffizienter (Öl) oder deletierter (TM) Mäuse wurden über Nacht mit bzw. ohne SIINFEKL kultiviert und intrazellulär auf IFN- γ Produktion gefärbt. Die IFN- γ Produzenten wurden in Verhältnis zu den antigenspezifischen Zellen innerhalb der CD8+ Zellen gesetzt. (B) Für ELISPOT Experimente wurden Milzzellen CD28 suffizienter (Öl) oder deletierter (TM) Mäuse über Nacht mit bzw. ohne SIINFEKL kultiviert und entwickelt. Die positiven Spots wurden ebenfalls in Verhältnis zu antigenspezifischen Zellen gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

Daher wurde ein verändertes Stimulationsprotokoll entwickelt, das den zeitgleichen Nachweis des antigenspezifischen TZR sowie intrazellulärer Zytokine zulässt. Durch eine nur fünfstündige Inkubation in Anwesenheit von Antigen, Brefeldin A sowie Monensin wurden die Zellen lange genug stimuliert, um die IFN- γ Produktion nachweisen zu können, ohne die Zellen durch die Blockade des Proteintransportes zu schädigen. Durch die kurze Inkubationsdauer wird der TZR nur in einem geringen Maße herunterreguliert, sodass er noch mit Streptamerfärbung nachgewiesen werden konnte. Als weiteren funktionalen Marker wurde das Molekül CD107a gefärbt (Ruitenbergh, Ghanekar et al. 2007). CD107a (LAMP-1) ist ein Glykoprotein der Lysosomenmembran, das zusammen mit CD107b (LAMP-2) das häufigste Glykoprotein der Membran lytischer Granula ist.

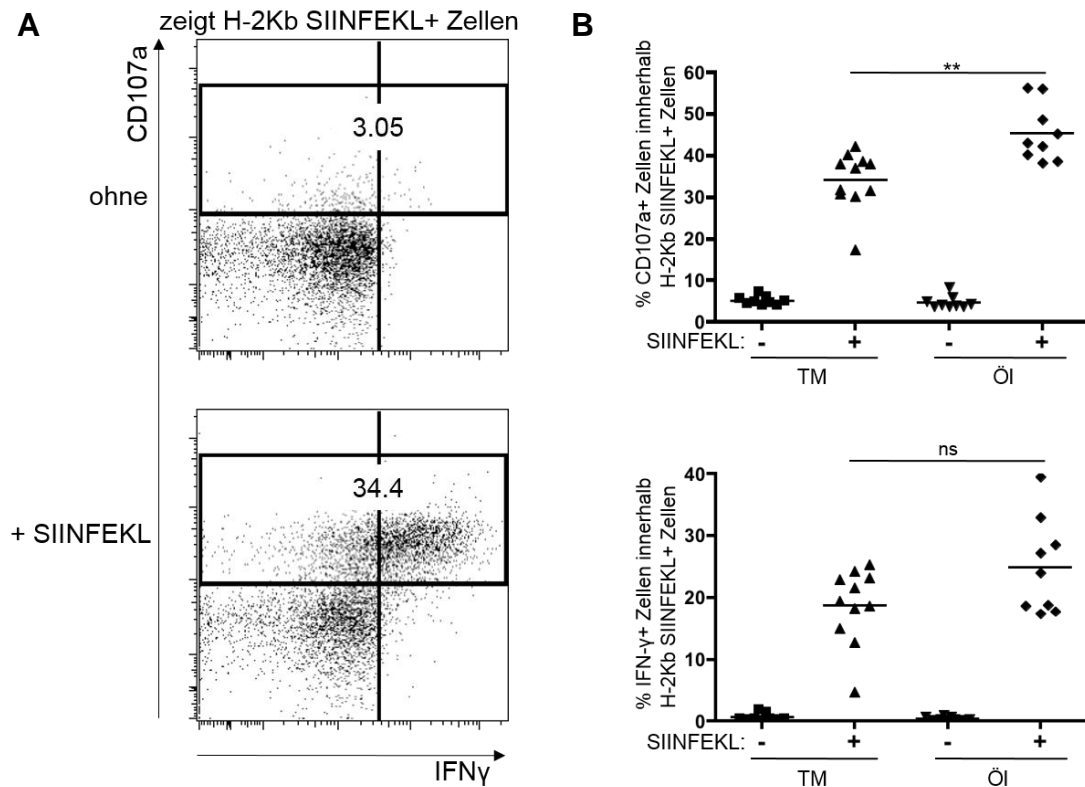


Abbildung 6: Degranulationsassay zur Bestimmung der IFN- γ Produktion sowie CD107a Exposition antigenspezifischer Milzzellen. (A) FACS-Plot antigenspezifischer Milzzellen bezüglich CD107a Exposition und IFN- γ Produktion unstimuliert, sowie nach SIINFEKL Stimulation. (B). CD107a+ sowie IFN- γ + Milzzellen CD28 suffizienter (ÖI) bzw. deletierter (TM) Mäuse nach Antigenstimulation. Die Daten zeigen die Mittelwerte von zwei gepoolten Experimenten mit jeweils 4-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

Setzt eine Zelle Granula frei, so wird CD107a und CD107b kurzfristig an der Zelloberfläche exponiert und wieder rasch durch Endocytose aufgenommen (Fukuda 1991). Durch Zugabe des anti-Maus CD107a Antikörpers über den gesamten Stimulationszeitraum konnte die Exposition des Moleküls nachgewiesen werden. Abbildung 6A zeigt ein Beispiel der FACS Daten antigenspezifischer, unstimulierter sowie SIINFEKL stimulierter CD8 Zellen, welche mit anti-Maus CD107a und anti-Maus IFN- γ gefärbt wurden. Bei Vergleich der Degranulation und IFN- γ Produktion antigenspezifischer CD8 Zellen in der Abwesenheit von Kostimulation mit den Werten von CD28 suffizienten Zellen (Abb. 6B), offenbarte sich direkt eine Verringerung des Anteils an degranulierenden, antigenspezifischen Zellen. Der Anteil der IFN- γ Produzenten hingegen wurde nicht beeinflusst. Somit wurde durch Deletion von CD28 im gesamten Immunsystem die Expansion der antigenspezifischen CD8-Effektorzellen klar eingeschränkt. Deren Funktionalität wurde bezüglich IFN- γ Produktion nicht

reduziert, jedoch sank die Anzahl degranulierender antigenspezifischer Effektorzellen aufgrund des Ausbleibens kostimulatorischer Signale.

Die Deletion von CD28 wird durch Tamoxifenbehandlung über das ER-Cre-Fusionsprotein ausgelöst. Tamoxifen selbst ist ein Östrogenanalog, das im murinen Organismus östrogenähnliche Wirkung zeigt und ungewünschte Nebenwirkungen in verschiedenen murinen Experimenten hervorruft (Reinert, Kantz et al. 2012, Zhong, Sun et al. 2015). Um eine mögliche Beeinträchtigung der Infektionsexperimente durch Tamoxifen zu ermitteln, wurde ein Infektionsexperiment analog zu den bisherigen Deletionsexperimenten (siehe Abb. 2) durchgeführt, jedoch mit CD28 heterozygoten Tieren, die kein Cre-Gen tragen und somit nicht deletiert werden können. Eine Gruppe wurde als Kontrollgruppe mit Öl behandelt und eine zweite mit Tamoxifen, jeweils direkt vor der Sekundärantwort. Die Analyse erfolgte analog zu den bisherigen Deletionsexperimenten am Tag 5 nach Sekundärinfektion. Es zeigte sich kein Unterschied in Tamoxifen- und Öl-behandelten Mäusen bezüglich CD4, CD8 Lymphozyten oder regulatorische T-Zellen in verschiedenen Organen (Abb. 7A). Auch der Anteil antigenspezifischer Zellen sowie Interferon- γ Produzenten nach Restimulation wurde durch Tamoxifen nicht verändert (Abb. 7B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Analyse und Auswertung der Experimente nicht durch die Nebenwirkungen von Tamoxifen beeinflusst werden und die Schlussfolgerungen der Experimente dem Ausbleiben der Kostimulation zugeschrieben werden können.

Zusammenfassend hat somit die globale Deletion von CD28 eine Einschränkung bezüglich Expansion sowie Degranulation antigenspezifischer Zellen in der sekundären Immunantwort zur Folge. Diese Einschränkungen werden nicht durch die Tamoxifenbehandlung ausgelöst, sondern sind Folge des Verlustes kostimulatorischer Signale während der Sekundärantwort.

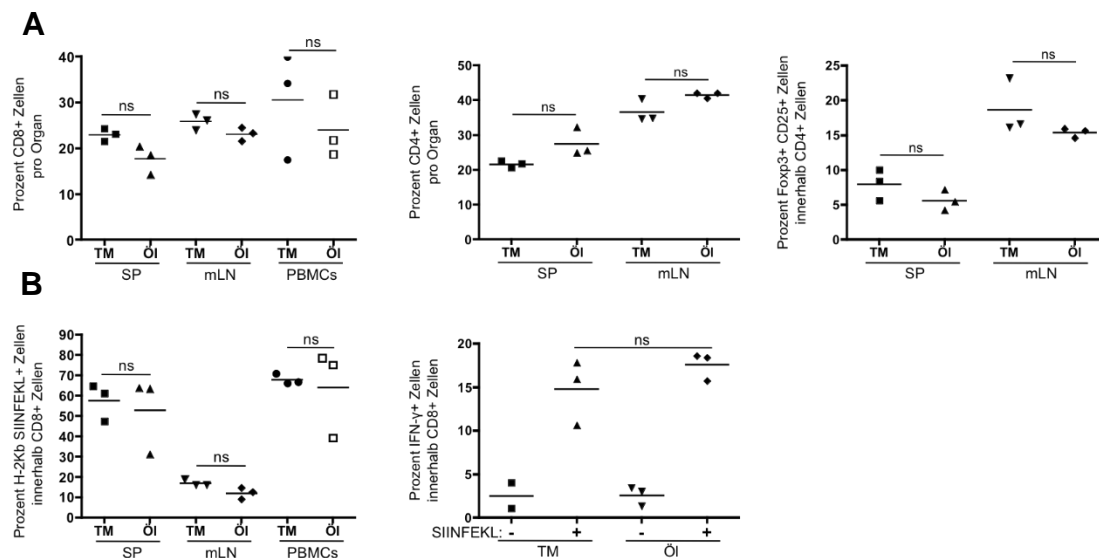


Abbildung 7: Auswirkung der Tamoxifenbehandlung auf die Immunantwort von CD28 heterozygoten Mäusen. CD28^{+/-} Mäuse wurden vor der Sekundärinfektion mit Tamoxifen behandelt und dessen Auswirkung auf die Gedächtnisimmunantwort untersucht. (A) Anteil an CD8, CD4 und regulatorischen (Foxp3⁺, CD25⁺) Zellen innerhalb der verschiedenen Organe nach Tamoxifen (TM) bzw. Kontrollbehandlung (Öl). (B) Anteil an antigenspezifischen Zellen innerhalb der CD8⁺ Population in den verschiedenen Organen und Anteil der IFN- γ Produzenten innerhalb der CD8⁺ Population nach über Nacht Stimulation mit Antigen von Tamoxifen behandelten (TM) und Kontrolltieren (Öl). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 3 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

4.1.2 Beeinträchtigung der Kostimulation durch Blockade der CD28-CD80/86 Interaktion führt zu eingeschränkter sekundärer Immunantwort

Die Fragestellung, inwieweit die sekundäre Gedächtnisantwort von CD28 vermittelter Kostimulation abhängig ist, wurde nicht nur mit der induzierbaren iCD28ko Mauslinie untersucht, sondern auch mit dem in unserem Institut generierten anti-CD28 Antikörper E18 (Dennehy, Elias et al. 2006, Beyersdorf, Ding et al. 2008). Dieser wurde in Mäusen generiert, sodass bei der Behandlung mit E18 keine neutralisierenden Immunreaktionen des Wirtsorganismus eintreten, auch nicht bei wiederholten Injektionen über einen längeren Zeitraum. Zudem wirkt er *in vivo* weder aktivierend noch modulierend auf das Immunsystem des Wirts, sondern blockierend (Beyersdorf, Ding et al. 2008), sodass er gegenüber bisherigen verfügbaren anti-Maus CD28 Antikörpern deutliche Vorteile aufweist. Damit die Gedächtnisantwort unter CD28 Blockade untersucht werden konnte, wurden B6 Mäuse zunächst mit geringer Dosis *Lm-OVA* infiziert, um immunologisches Gedächtnis zu generieren. Nach einem Monat wurde mit hoher

Dosis infiziert, um das Gedächtnis abzurufen. Das Injizieren der ersten Dosis E18 (200 µg in PBS, Kontrolltiere erhielten reines PBS) fand vor der Sekundärinfektion statt und wurde jeden zweiten Tag bis zur Analyse am Tag 5 wiederholt (Abb. 8).

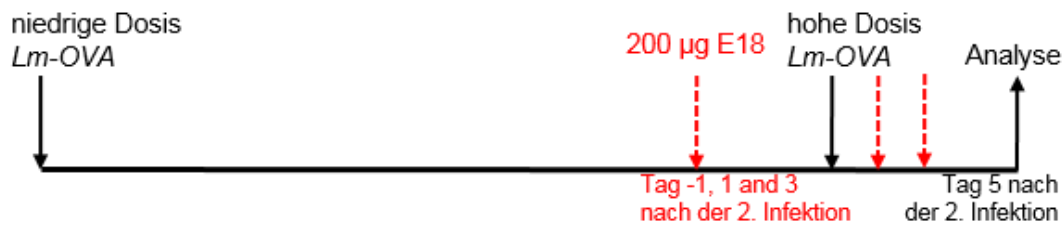


Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Blockade von CD28 mit E18 während der Sekundärinfektion

Um antigenspezifische Zellen am Tag der Analyse nachzuweisen, wurden Zellen der Milz, der Mesenteriallymphknoten und PBMCs (peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) mit Streptameren® gefärbt. Durch Blockade von CD28 wurde die Expansion antigenspezifischer Zellen um 50 % eingeschränkt, sowohl in der Milz als auch in frei zirkulierenden Lymphozyten der Peripherie, und zwar in Prozenten (Abb. 9A) und in absoluten Zellzahlen (Abb. 9B). Die Effektorfunktion antigenspezifischer CD8 Lymphozyten der Milz wurde durch die Blockade von CD28 geringfügig eingeschränkt, wobei die Degranulationsaktivität um 25 % reduziert (Abb. 9C), jedoch die IFN- γ Aktivität nicht signifikant eingeschränkt wurde (Abb. 9D).

Wie bereits mit der globalen CD28 Deletion nachgewiesen, so führt eine Blockade des CD28 Rezeptors während der Sekundärinfektion ebenfalls zu einer deutlichen Einschränkung der Expansion antigenspezifischer Zellen. Die Effektorfunktion dieser Zellen wird bezüglich deren Degranulation geringfügig beeinflusst.

An dieser Stelle kann zusammenfassend gesagt werden, dass mit beiden methodischen Herangehensweisen, also CD28 Deletion und Blockade, die gleiche Schlussfolgerung gezogen werden kann. Kostimulation spielt demnach für die Expansion der Gedächtniszellen und deren Funktionalität eine bedeutende Rolle und die Ergebnisse der bisherigen Forschung auf diesem Gebiet (vgl. Tabelle 1) wurden mit den überlegenen Methoden bestätigt.

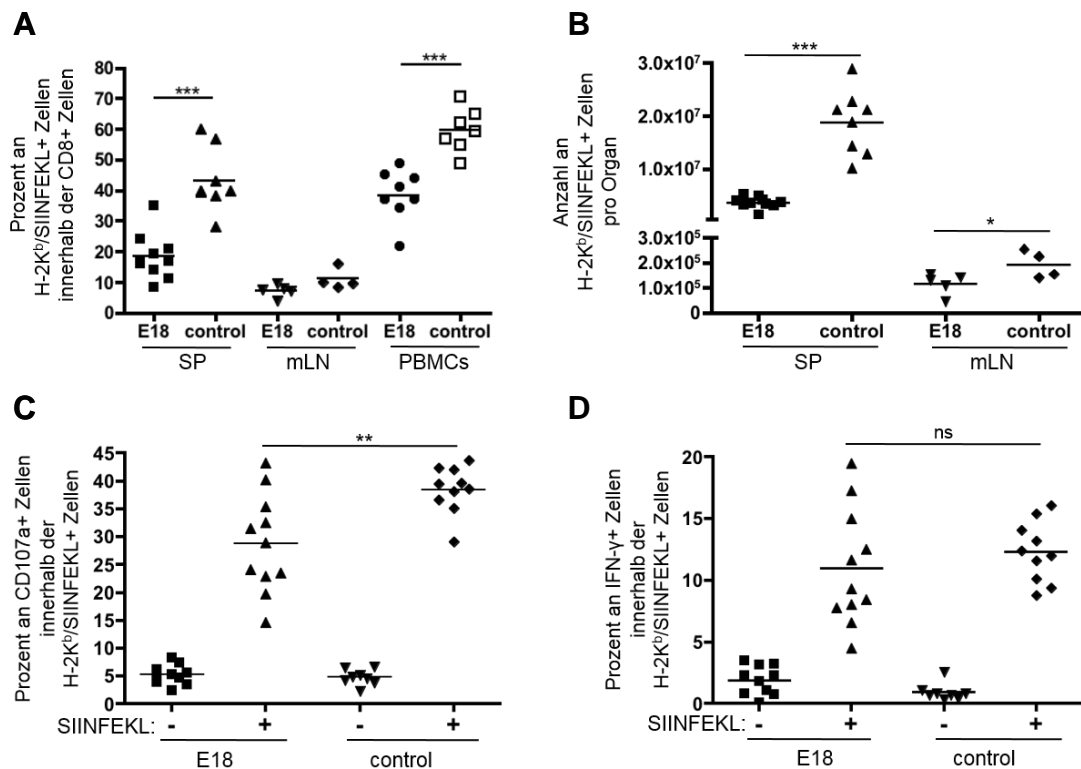


Abbildung 9: Expansion und Effektorfunktion antigenspezifischer CD8 Zellen während der Sekundärinfektion unter CD28 Blockade mit E18. Am Tag 5 nach der Sekundärinfektion mit bzw. ohne CD28 Blockade durch E18 wurden antigenspezifische Zellen mittels Streptamer® Färbung nachgewiesen. Dargestellt sind Prozente antigenspezifischer Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) in verschiedenen Organen von wildtypischen (control) oder CD28 blockierten (E18) Mäusen. (C) Milzzellen E18 behandelter bzw. von Kontrollmäusen wurden *in vitro* in Anwesenheit von SIINFEKL für 5h restimuliert und die Effektorfunktion antigenspezifischer Zellen durch CD107a Exposition (C) und IFN- γ Produktion (D) nachgewiesen. Die Daten zeigen die Mittelwerte von zwei gepoolten Experimenten mit jeweils 4-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

4.1.3 Transiente Blockade der Kostimulation während der Primärantwort und der Etablierung des Gedächtnisses hat keinen Einfluss auf die sekundäre Immunantwort

Die Blockade des CD28 Moleküls mit E18 Antikörper hat gegenüber der globalen Deletion in iCD28ko Mäusen den Vorteil, dass sie reversibel ist. Nach einem Blockadezeitraum wird der Antikörper vom Organismus abgebaut und CD28 Moleküle stehen zur Signalgebung wieder zur Verfügung. Daher wurden Experimente entworfen, bei denen das CD28 Molekül zum einen während der Primärinfektion und zum anderen während der Etablierung des Gedächtnisses, also über einen definierten Zeitraum, mit E18 geblockt werden sollte.

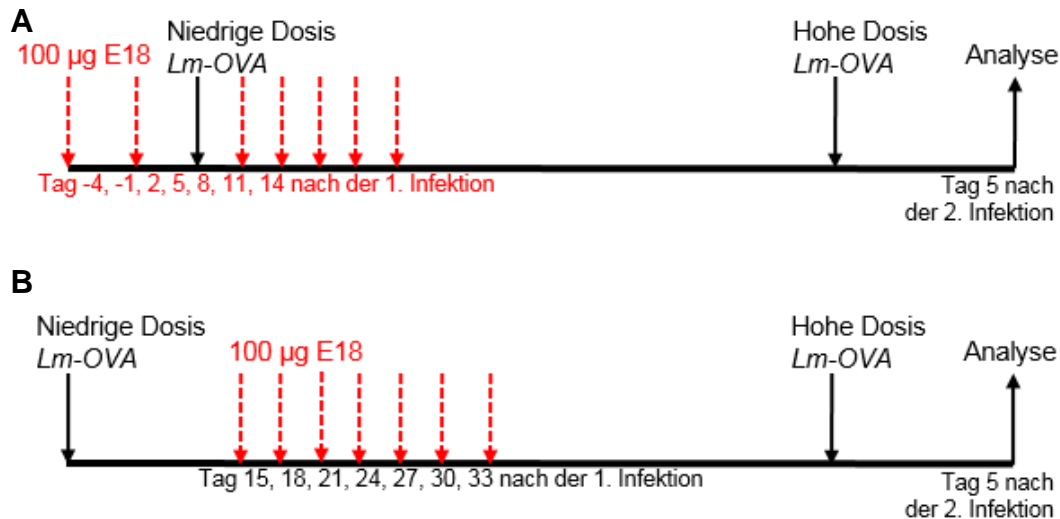


Abbildung 10: Versuchsaufbau zur Blockade von CD28 mit E18 während der Primärantwort (A) und Etablierung des Gedächtnisses (B)

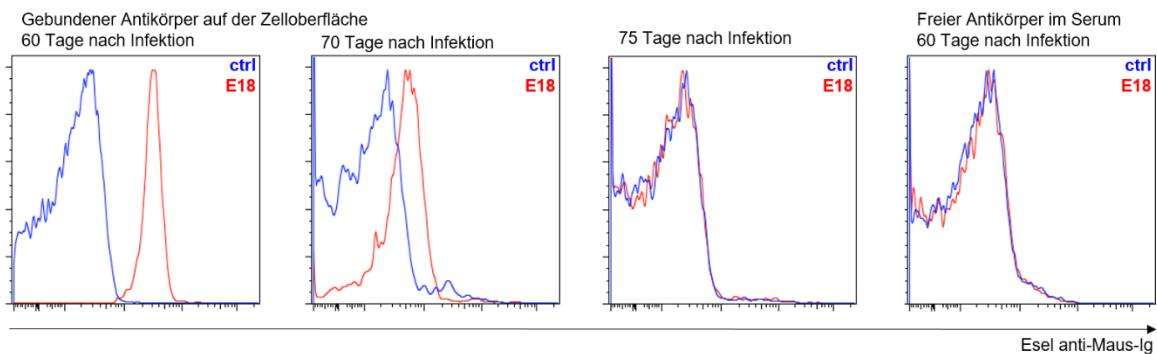
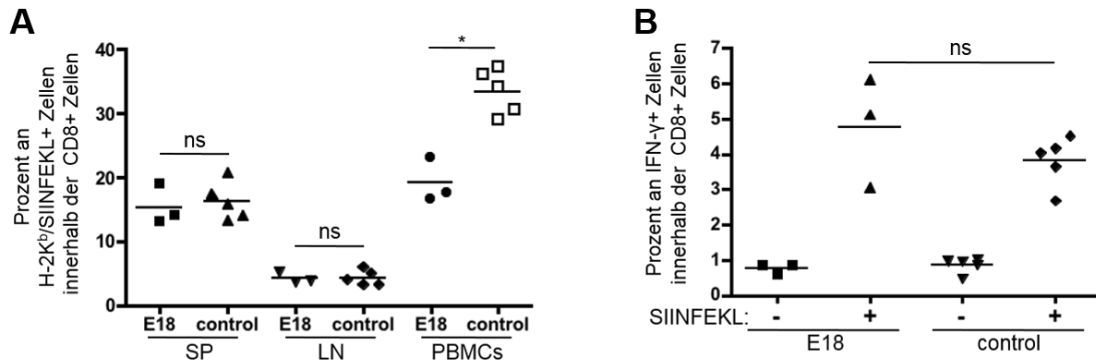


Abbildung 11: Nachweis von E18 auf der Zelloberfläche der PBMCs und im Serum E18 behandelter Mäuse. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Primärinfektion wurden E18 behandelten und unbehandelten Tieren Blut entnommen. Das Serum wurde aufbereitet, mit Lymphozyten einer wildtypischen Maus inkubiert und die Bindung von Mausantikörpern an die Zelloberfläche mit PE konjugiertem Esel anti-Maus Immunglobulinen nachgewiesen (Grafik 1-3). PBMCs wurden isoliert und an deren Oberfläche gebundener Antikörper wurde direkt durch Esel anti-Maus Färbung nachgewiesen (Grafik 4).

Mit diesem Aufbau wurde analysiert, inwiefern eine vorübergehende Unterdrückung kostimulatorischer Signale (A: während der Primärinfektion, B: beim Rückgang der Immunreaktion und Entstehung des Gedächtnisses) die Sekundärantwort beeinflussen kann. B6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 10 gezeigt, mit geringer Dosis infiziert und mit jeweils 7 E18 Injektionen (100 µg) entweder während der Primärantwort (Abb. 10A, Tag -4 bis 14) oder der Etablierung des Gedächtnisses (Abb. 10B, Tag 15 bis 33) behandelt, um das CD28 Molekül zu blockieren. Nach der Blockadeperiode wurde den Mäusen zu

verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen und auf Anwesenheit von E18 Antikörpern im Serum sowie auf der Zelloberfläche der PBMCs untersucht.

Blockade während der Primärinfektion



Blockade beim Rückgang der Immunreaktion und Entstehung des Gedächtnisses

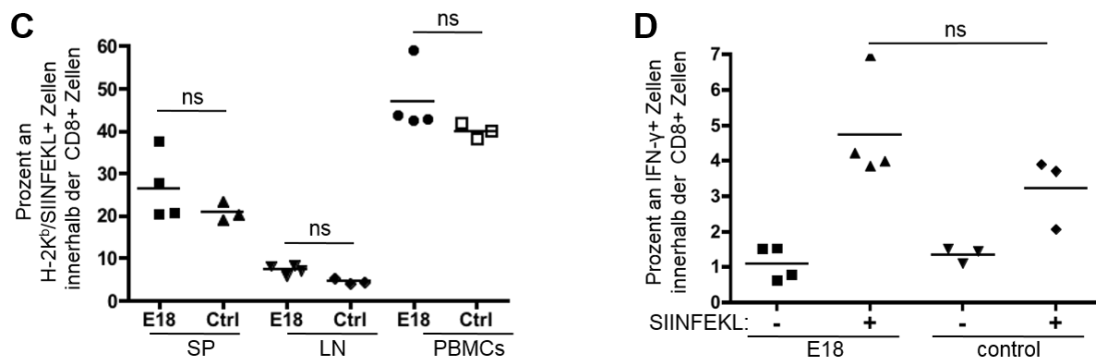


Abbildung 12: Expansion und Effektorfunktion antigenspezifischer Zellen während der Sekundärantwort nach transientser CD28 Blockade während der Primärantwort (A, B) oder der Etablierung des Gedächtnisses (C, D). An Tag 5 nach Sekundärinfektion wurden antigenspezifische Zellen der Milz, der Mesenteriallymphknoten und der PBMCs mittels Streptamerfärbung® (A,C) und IFN- γ Produzenten nach Restimulation der Milzzellen mit Antigen durch Intrazellulärfärbung (B, D) nachgewiesen. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 3-4 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,01, ns: kein signifikanter Unterschied.

Abbildung 11 zeigt für den Versuchsaufbau A den Erhalt des Antikörpers auf der Zelloberfläche bis 70 Tage nach Primärinfektion. Auch wenn im Serum nach 60 Tagen kein frei zirkulierender Antikörper mehr nachweisbar war, konnte erst 75 Tage nach Primärinfektion bestätigt werden, dass CD28 Moleküle auf der Zelloberfläche nicht weiter geblockt werden. Nachdem der Antikörper komplett aus dem Serum und von der Zelloberfläche verschwunden war, wurde das Gedächtnis durch erneute Listerieninfektion abgerufen und 5 Tage später analysiert. Unabhängig vom Behandlungszeitraum wurde weder in der Milz noch in den

Mesenteriallymphknoten der Anteil antigenspezifischer Zellen des CD8 Zellpools durch E18 Behandlung eingeschränkt (Abb. 12A, C). Lediglich unter den zirkulierenden antigenspezifischen Zellen des Blutes (PBMCs) wurde eine Reduktion der Sekundärantwort nach E18 Behandlung während der Primärantwort beobachtet, was auf eine Änderung der Etablierung des Migrationsverhaltens hinweisen könnte. Die IFN- γ Produktion der CD8 Milzzellen wurde durch E18 Behandlung nicht verringert (Abb.12B, D). Somit wird die Expansion der Gedächtniszellen und deren Funktionalität durch CD28 Blockade während der Primärantwort bzw. Etablierung des Gedächtnisses nicht beeinträchtigt. Unterschiede im Gedächtnispool zum Zeitpunkt der Reinfektion wurden nicht untersucht und daher können keine Rückschlüsse auf die Gedächtniszellen an sich gezogen werden.

4.1.4 Deletion von CD4 T-Zellen während der Sekundärinfektion führt zu verstärkter Effektorantwort – auch unter Blockade von CD28

Eine globale Deletion oder Blockade von CD28 während der Sekundärantwort schränkt diese ein (siehe 4.1.2). Die Frage, ob die Einschränkung der Sekundärantwort auf zellintrinsischen Effekten innerhalb CD8 Effektorpopulation selbst beruht oder durch den Einfluss anderer Zelltypen, wie CD4 oder regulatorischer T-Zellen, die ebenfalls von CD28 vermittelter Kostimulation abhängen, ausgeübt wird, soll nun betrachtet werden.

Es ist bereits bekannt, dass im System der Listerieninfektion eine Deletion der CD4 T-Zellen während der Sekundärantwort zu einer verstärkten CD8 Effektorantwort führt (Kursar, Bonhagen et al. 2002). Eine Effektorantwort wird immer durch unterdrückende Effekte von regulatorischen CD4 T-Zellen in Schach gehalten. Fallen diese Effekte durch Deletion der CD4 Zellen weg, so läuft die CD8 vermittelte Immunantwort verstärkt ab. Um dieses Phänomen im Kontext der Kostimulation zu untersuchen, wurde ein Experiment, wie unter 4.1.2 (Blockade mit E18 während der Sekundärinfektion) beschrieben, durchgeführt. Es wurden jedoch zusätzlich Gruppen verglichen, bei denen während der Sekundärantwort die Population der CD4 Zellen durch Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper GK1.5 deletiert wurde (vgl. Abb. 13).

Mit diesem gekoppelten Blockade- und Deletionsexperiment wurde zum einen reproduziert, dass eine Deletion der CD4 T-Zellen zu einer verstärkten Expansion der CD8 Effektorzellen führt (Abb. 14, vgl. control und GK1.5). Weiterhin wurde gezeigt, dass diese verstärkte Antwort (ohne CD4 T-Zellen) ebenso durch Blockade der Kostimulation reduziert wird (vgl. GK1.5 und GK1.5 + E18), sowohl in Prozenten als auch in absoluten Zellzahlen (Abb. 14A, B). Aus diesem Ergebnis lässt sich direkt schließen, dass die Einschränkung in der Expansion des Effektorzellpools auf zellintrinsic, kostimulatorischen Signalen der CD8 Effektorzellen beruht. Hinsichtlich der Effektorfunktionen der CD8 Zellen führt die Abwesenheit der CD4 T-Zellen zu verstärkter Degranulation und IFN- γ Produktion (Abb.14C, D, vgl. GK1.5 und control). Bei zusätzlicher Blockade der Kostimulation wird die Effektorfunktion eingeschränkt (GK1.5 + E18) wie auch bei Blockade der Kostimulation in Anwesenheit der CD4 T-Zellen (vgl. E18 und control). Folglich sind für die Einschränkungen bezüglich der Expansion antigenspezifischer Zellen und des Ausübens der Effektorfunktionen zellintrinsic, kostimulatorische Effekte innerhalb der CD8 Zellen verantwortlich und weniger extrinsic Effekte durch CD4 Helfer- oder regulatorische T-Zellen.

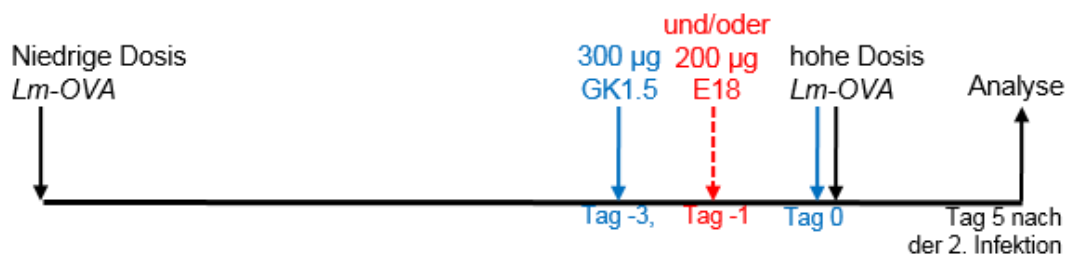


Abbildung 13: Versuchsaufbau zur Blockade von CD28 und Deletion der CD4 T-Zellen
(4 Gruppen: E18 Blockade, CD4 Deletion, CD3 Deletion + E18 Blockade, Kontrollgruppe)

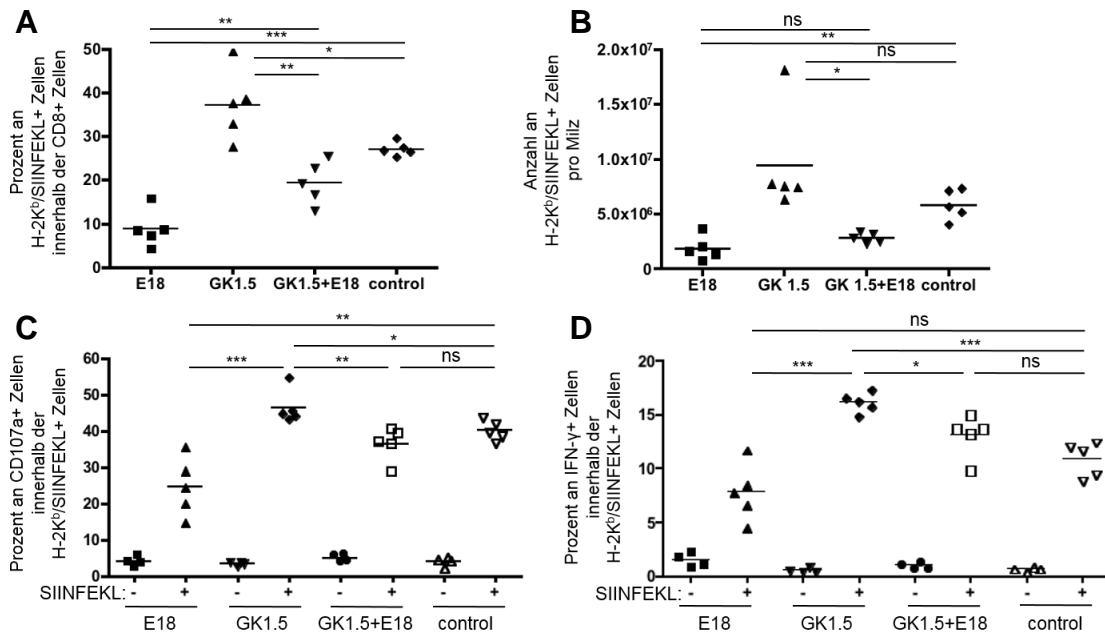


Abbildung 14: Expansion und Effektorfunktion antigenspezifischer Zellen während der Sekundärantwort, bei welcher CD4 Zellen deletiert wurden und/oder zusätzlich Kostimulation geblockt wurde. Am Tag 5 nach Sekundärinfektion, welche unter CD28 Blockade (E18), Deletion der CD4 Zellen (GK1.5), unter CD28 Blockade und Deletion der CD4 Zellen (GK1.5+E18) oder ohne Intervention (control) ablief, wurden H-2K^b/SIINFEKL⁺ Zellen mithilfe von Streptamer® Reagenz nachgewiesen. Der Anteil antigenspezifischer Zellen innerhalb der CD8 Zellen der Milz (A) und deren absolute Zellzahl pro Milz (B) sind dargestellt. Milzzellen wurden für 5 h *in vitro* mit Antigen restimuliert und die Effektorfunktion bezüglich Degranulation mittels CD107a Exposition (C) und IFN- γ Produktion (D) nachgewiesen. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,01, ns: kein signifikanter Unterschied.

4.2 Analyse der Primär- und Sekundärantwort von transferierten, CD28 deletierbaren CD8 T-Zellen in Konkurrenz mit endogenen CD28 suffizienten Zellen

Bisherige Experimente zeigen deutlich einen Einfluss der Kostimulation auf die Immunantwort der CD8 Gedächtniszellen. Unter 4.1.4 konnte belegt werden, dass in Abwesenheit kostimulatorischer Signale Gedächtnisreaktionen der CD8 T-Zellen aufgrund zellintrinsischer Effekte eingeschränkt ablaufen und nicht durch andere kostimulationsabhängige Zellentypen verursacht werden. Die Methode, die CD4 T-Zellen komplett zu entfernen, greift jedoch stark in die Immunantwort ein. Eine präzisere Möglichkeit, die Rolle der Kostimulation in CD8 Effektorzellen in einem sonst intakten Immunsystem zu untersuchen, bieten Transferexperimente, bei denen CD28 nur in Donor-CD8 T-Zellen deletiert wird. Zu diesem Zweck wurde die Mauslinie OT-I Thy1.1 iCD28ko gezüchtet. Das Genom dieser Mäuse enthält ein funktionelles gefloxtes CD28 Allel und ein permanent inaktiviertes Allel. CD8 T-Zellen dieser Mäuse wurden stets in CD28 heterozygote Mäuse transferiert, um die CD28 Expression in transferierten Zellen und Zellen der Empfängertiere vergleichbar zu halten. Durch die Expression des allotypischen Markers Thy1.1 können transferierte Zellen in den Empfängermäusen wiedergefunden werden und da sie zudem den transgenen T-Zell-Rezeptors OT-I (erkennt das SIINFEKL-Peptid, präsentiert von H-2K^b Molekülen) exprimieren, wird eine vergleichbare klonale Expansion der transferierten Zellen in den Empfängermäusen nach Infektion mit OVA-sezernierenden Listerien ermöglicht. Mit diesem Transfersystem sollte die Expansion transferierter Zellen mit bzw. ohne Kostimulation im Vergleich zu endogenen Zellen während der Primär- und Sekundärantwort untersucht werden.

4.2.1 Titration der transferierten Zellen

In einem Vorexperiment wurde die Anzahl an transferierten Zellen titriert, um die Zellzahl zu bestimmen, die ein sicheres Wiederfinden der Zellen ermöglicht und zudem die endogenen Zellen in gleichem Maße expandieren lässt. Dazu wurden logarithmisch von $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^2$ abnehmende Mengen an OT-I Thy1.1 Zellen in Empfängermäuse injiziert und die Expansion antigenspezifischer Zellen nach der

Primär- und Sekundärantwort untersucht (Abb. 15). Wurden $1 \cdot 10^6$ oder $1 \cdot 10^5$ Zellen transferiert, so expandierten diese Zellen enorm, sowohl bei der Primär-, als auch bei der Sekundärantwort. Endogene Zellen expandierten kaum, vermutlich aufgrund der Konkurrenz mit den OT-I Thy1.1 Zellen um Antigen. Ab einer Verdünnung von $1 \cdot 10^4$ Zellen konnten endogene antigenspezifische Zellen expandieren und bei $1 \cdot 10^3$ transferierten Zellen bildeten transferierte und endogene Zellen einen gemeinsamen Effektorpool, sowohl bei der Primär- als auch bei der Sekundärantwort. Bei weiterer Verdünnung auf $1 \cdot 10^2$ Zellen konnten transferierte Zellen kaum wiedergefunden werden (Abb. 16).

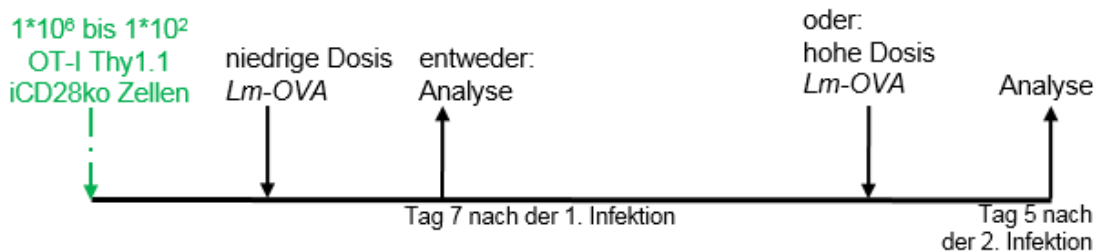


Abbildung 15: Versuchsaufbau zum Experiment Titration der OT-I Thy1.1 iCD28ko Zellen

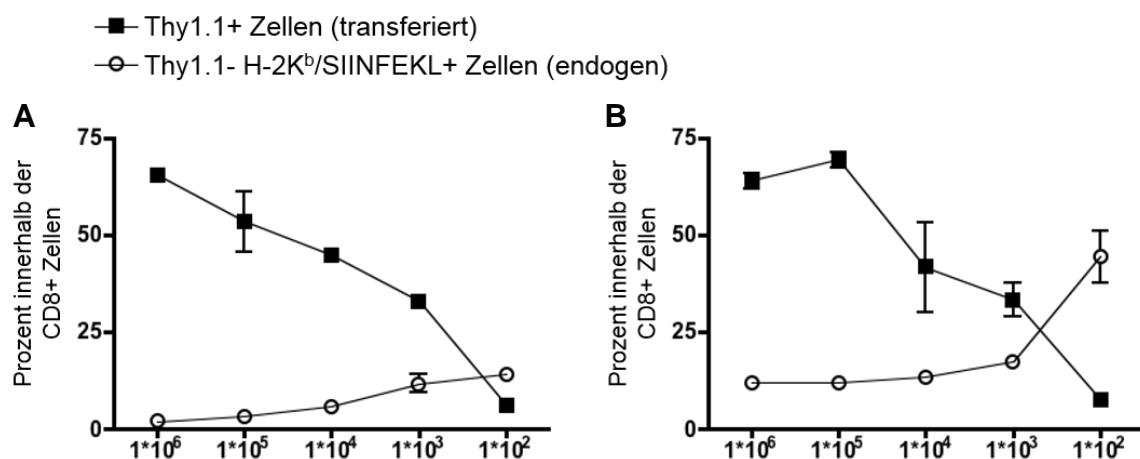


Abbildung 16: Expansion der transferierten und endogenen antigenspezifischen Zellen nach Primär- und Sekundärinfektion bei unterschiedlicher Anzahl transferierter Zellen. Zellverdünnungen von $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^2$ CD8 T-Zellen von OT-I Thy1.1 iCD28ko Tieren wurden in Empfängertiere injiziert und die Tiere mit geringer Dosis Lm-OVA infiziert. 7 Tage nach Infektion wurden die Tiere analysiert und transferierte und endogene, antigenspezifische (H-2K^b/SIINFEKL+) Zellen in der Milz nachgewiesen (A). Weitere Tiere wurden nach einem Monat erneut mit hoher Dosis infiziert und nach 5 Tagen in gleicher Weise analysiert (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 3 Mäusen pro Zellverdünnung.

Aufgrund dieser Daten wurde die Anzahl zu transferierender Zellen auf $1 \cdot 10^3$ festgelegt, welche auch etwa der endogenen H-2K^b/SIINFEKL-spezifischen Population entspricht (Blattman, Antia et al. 2002, Badovinac, Haring et al. 2007). Mit dieser Zellzahl kann also eine „faire“ Wettbewerbssituation zwischen transferierten und endogenen Zellen, die das SIINFEKL Antigen erkennen, hergestellt werden.

4.2.2 Selektive Deletion des CD28 Gens in transferierten Zellen vor der Primärantwort führt zu eingeschränkter Expansion mit verstärkter Effektorfunktion

Mithilfe des Transfersystems, das eine Analyse der transferierten und der endogenen, antigenspezifischen Zellen erlaubt, sollte zunächst die Primärantwort untersucht werden. Dazu wurden jeweils 1000 OT-I Thy1.1 iCD28ko CD8 T-Zellen in CD28 heterozygote Empfängertiere injiziert und anschließend eine Immunantwort durch eine Listerieninfektion geringer Dosis ausgelöst. Am Höchststand der Primärantwort (Tag 7) wurden die Empfängertiere analysiert (Versuchsablauf siehe Abb. 17). Transferierte und endogene Zellen können durch Analyse der Expression des kongenen Markers Thy1.1 unterschieden werden (siehe Abb. 18, Gatingstrategie nach CD8 und Thy1.1). Um sicher zu gehen, dass nach Tamoxifenbehandlung das CD28 Molekül auf den transferierten Zellen nicht weiter exprimiert wird, wurde zu jedem Experiment eine Analyse der CD28 Oberflächenexpression durchgeführt. Dazu wurde das CD28 Signal Thy1.1 positiver Zellen (transferierte Zellen) und endogener, antigenspezifischer Zellen (Abb. 18, Dot Plot nach CD8 H-2K^b/SIINFEKL) im Histogramm gegenübergestellt. Somit wurde nachgewiesen, dass das CD28 Molekül nach Tamoxifenbehandlung von der Oberfläche der transferierten Zellen verschwunden ist, es wird also kein funktionelles CD28 Molekül mehr transkribiert, wohingegen die Kontrollbehandlung mit Öl die Expression von CD28 auf transferierten Zellen im Vergleich zu endogenen CD28 heterozygoten Zellen nicht verändert (Abb. 18, Histogramme). Im Transfersystem lässt sich CD28 also zuverlässig nur in transferierten Zellen deletieren.

Wurde bei der Primärantwort die Expansion der transferierten CD28 deletierten und CD28 suffizienten Zellen analysiert, so offenbart sich eine reduzierte Expansion CD28 deletierter Zellen sowohl anteilig als auch in absoluten Zellzahlen (Abb. 19A und B, links). Im Gegenzug expandierten endogene antigenspezifische (Thy1.1⁻; H-2K^b/SIINFEKL⁺) Zellen umso besser, je geringer die Expansion transferierter Zellen ausfiel, ebenfalls in Prozenten und in absoluten Zellzahlen (Abb. 19A und B, rechts). Antigen-spezifische Zellen befinden sich somit klar in einer Wettbewerbssituation, in der die Expansion durch die Expression von CD28 deutlich positiv beeinflusst wird. Erstaunlicherweise zeigte die Analyse der Effektorfunktion der transferierten Zellen eine erhöhte Frequenz degranulierender und IFN- γ produzierender Zellen nach CD28 Deletion im Vergleich zu CD28 suffizienten transferierten Zellen (Abb. 19C, D), und zwar um den Faktor 1,4 bzw. 2,2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die primäre Immunantwort gegen OVA-exprimierende Listerien bezüglich der Zellproliferation klar von zellintrinsic-vermittelter Kostimulation abhängt, jedoch führt die Abwesenheit von Kostimulation tendenziell zu einer Verstärkung der Effektorfunktionen der deletierten Zellen.

Für die Transferexperimente wurden weitere Analysen ausgearbeitet, mit denen die transferierten Zellen detaillierter analysiert werden konnten. Mit Hilfe eines neu entwickelten Färbeprotokolls war es möglich, die Effektorzellen bezüglich der Oberflächenmarker KLRG-1 und CD127 zu vergleichen und somit in Effektor- und Gedächtniszellvorläufer-Subtypen einzuteilen.

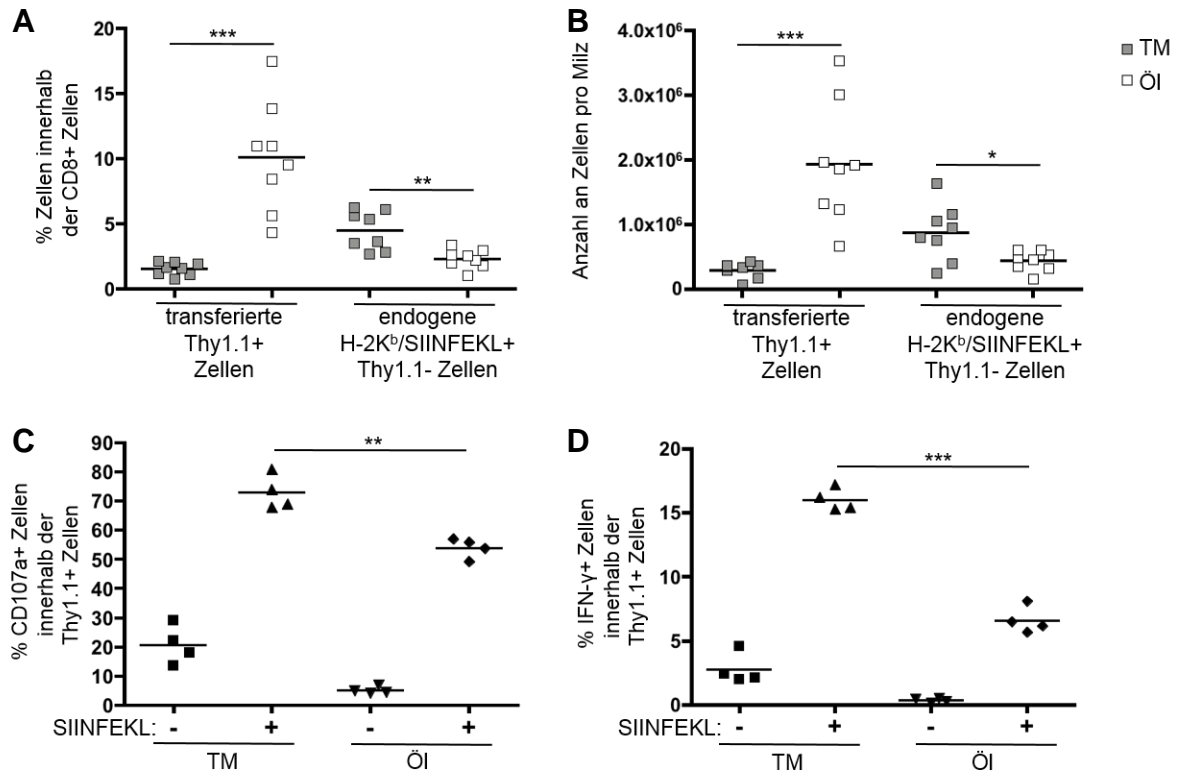


Abbildung 19: Expansion und Effektorfunktion transferierter CD8 T-Zellen am Höhepunkt der Primärinfektion nach CD28 Deletion oder Kontrollbehandlung sowie Expansion der endogenen antigenspezifischen Zellen. An Tag 7 nach der Primärinfektion wurden die Milzen der Empfängertiere analysiert und transferierte Zellen sowie antigenspezifische, H-2k^b/SIINFEKL positive, Thy1.1 negative Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen (A), sowie in absoluter Zellzahl (B) mit FACS Färbungen nachgewiesen. Milzzellen wurden für 5 h in Anwesenheit des Antigens SIINFEKL restimuliert und die Degranulation (C) sowie die IFN-γ Produktion (D) der transferierten Zellen durch FACS Färbung analysiert. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte von 3-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. In A und B werden gepoolte Daten aus 2 Experimenten gezeigt. Ungepaarter t-Test: * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,01, ns: kein signifikanter Unterschied.

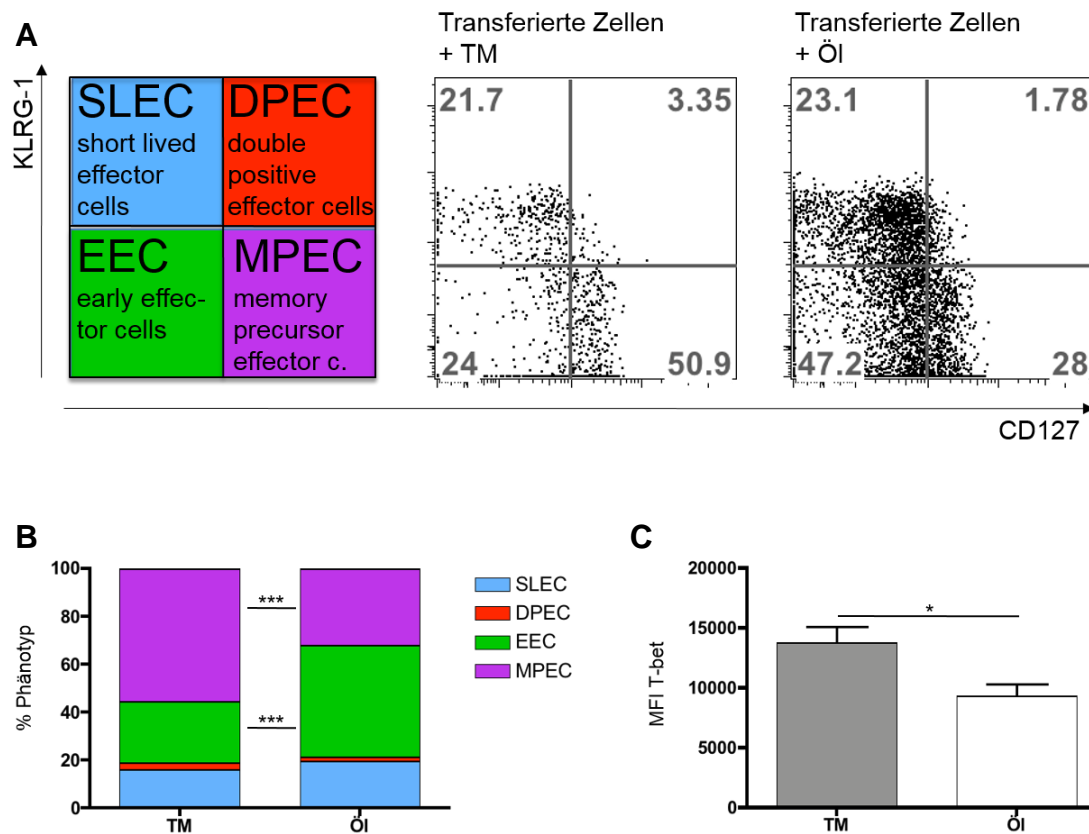


Abbildung 20: Phänotypisierung und Analyse der T-bet Expression transferierter Zellen am Tag 7 der Primärantwort. Aktivierte Zellen werden nach Expression der Oberflächenmoleküle CD127 und KLRG-1 in SLEC, DPEC, EEC und MPEC eingeteilt. Beispiele eines Dot Plots TM behandelter und ÖI behandelter transferierter Zellen nach Oberflächenfärbung werden gezeigt (A). B stellt die Zusammensetzung des Phänotyps transferierter Zellen nach CD28 Deletion (TM) bzw. Kontrollbehandlung (ÖI) dar, weiterhin wurde der MFI der T-bet Expression in transferierten Zellen durch intrazelluläre FACS Färbung ermittelt (C). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 5 Mäusen. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

Mittels dieser Marker können Zellen nach Aktivierung auf ihr Potential, sich in eine Effektor- oder Gedächtniszelle weiterzuentwickeln, untersucht werden. Joshi et al. und weitere entwickelten die Einteilung der aktivierten Zellen in folgende Subtypen (Joshi, Cui et al. 2007, Sarkar, Kalia et al. 2008, Obar, Jellison et al. 2011, Plumlee, Sheridan et al. 2013), welche schematisch in Abbildung 20A dargestellt sind. Effektorzellen finden sich vor allem in der KLRG-1 exprimierenden Population, bei der das CD127 Molekül herunterreguliert ist (SLEC, short lived effector cells, CD127-, KLRG-1+). Gedächtniszellen entwickeln sich vor allem aus der KLRG-1 niedrig oder nicht exprimierenden, CD127 positiven Population (MPEC, memory precursor effector cells, KLRG-1-, CD127+). Es finden sich auch Populationen, welche beide Marker exprimieren (DPEC, double positive effector

cells, CD127+, KLRG-1+) oder keine (EEC, early effector cells, CD127-, KLRG-1-). Naive Zellen hingegen exprimieren CD127, jedoch kein KLRG-1. Je effektiver die Aktivierung, desto mehr Zellen exprimieren mit fortgeschrittener Infektion KLRG-1 und regulieren CD127 herunter. Während einer Infektion und der starken Expansion des Effektorzellpools werden zunächst viele SLEC gefunden, welche sich mit dem Abklingen der Infektion zurückbilden und verstärkt Gedächtniszellen hervortreten lassen.

Eine Deletion von CD28 führte in transferierten Zellen zu einer geringeren Absenkung der Expression von CD127 im Vergleich zu CD28 suffizienten Zellen. Das zeigte sich im Dot Plot deletierter und CD28 suffizienter transferierter Zellen (Abb. 20A) und auch im Vergleich der Phänotypen der transferierten Zellen. Dort zeichnete sich eine signifikante Reduktion der frühen Effektorzellen (EEC) und eine signifikante Erhöhung der Gedächtnisvorläuferzellen (MPEC) nach CD28 Deletion ab (Abb 20B). Die transferierten Zellen wurden also in Abwesenheit kostimulatorischer Signale weniger gut aktiviert, zumindest in Bezug auf Repression des Oberflächenmarkers CD127. Weiterhin wurden die Zellen auf die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet, welcher für die Differenzierung in Effektorzellen und bei der Ausübung von Effektorfunktionen eine Rolle spielt, untersucht. Abb. 20C lässt eine erhöhte T-bet Expression in Tag 7 Effektorzellen nach CD28 Deletion erkennen, was das erwartete Ergebnis der verstärkten Effektorfunktion (erhöhte Degranulation und IFN- γ Produktion bei CD28 deletierten, transferierten Zellen) stützt.

4.2.3 Selektive Deletion des CD28 Gens in transferierten Zellen führt zu eingeschränkter Expansion bei der Sekundärantwort

Um den Einfluss von Kostimulation auf Gedächtniszellen untersuchen zu können, wurde mithilfe des Transfersystems die Sekundärantwort untersucht. Nach dem Transfer von 1000 OT-I Thy1.1 iCD28ko Zellen wurde CD28 entweder vor der Primärinfektion oder vor der Sekundärinfektion durch Applikation von Tamoxifen deletiert. Kontrollgruppen wurden jeweils mit Öl behandelt. Am Höhepunkt der Sekundärinfektion (Tag 5) wurden die Mäuse analysiert (siehe Abb. 21). Insgesamt wurden also drei Gruppen verglichen, und zwar Mäuse, die vor der

Primärantwort deletiert wurden (TM vor 1°), Mäuse, die vor der Sekundärantwort deletiert wurden (TM vor 2°) und Kontrollmäuse (ÖI), die nicht deletiert wurden.

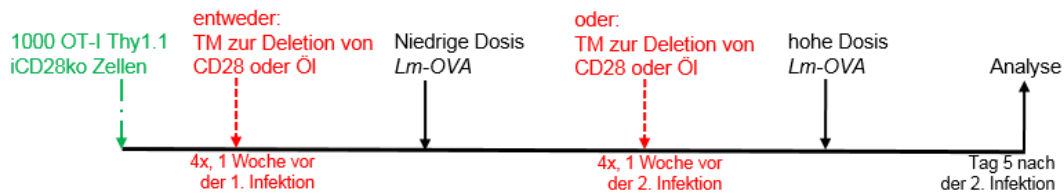


Abbildung 21: Versuchsaufbau Transfereperiment zur Analyse der Sekundärantwort

Betrachtet man zunächst die Expansion der transferten Zellen am Höhepunkt der Sekundärantwort, so vermehrten sich CD28 deletierte Zellen weniger stark (Abb. 22A, B). Wie zu erwarten, proliferierten Effektorzellen, bei denen CD28 vor der Primärantwort deletiert wurde, wenig, sodass deren Proliferation um den Faktor 4 reduziert war. Wurde CD28 vor der Sekundärantwort deletiert, so reduzierte sich die Expansion der transferten, deletierten Zellen um den Faktor 2. Dieser Effekt zeigte sich sowohl in den Prozentzahlen transferierter Zellen (Abb. 22A), als auch in absoluten Zellzahlen (Abb. 22B). Endogene antigenspezifische Zellen befanden sich im Wettbewerb mit den transferten Zellen und je stärker die Wettbewerbssituation (Ölbehandlung der transferten Zellen), desto geringer proliferierten diese. Bei einer CD28 Deletion vor der Primärantwort expandierten transferierte Zellen schwach und die endogenen antigenspezifischen Zellen bildeten den Hauptteil des Effektorzellpools. Die wechselseitige Beeinflussung transferierter und endogener antigenspezifischer Zellen offenbarte sich sowohl in Prozenten an den Gesamt-CD8-T-Zellen (Abb. 22A), als auch in absoluten Zellzahlen (Abb. 22B). Betrachtet man außerdem die Effektorfunktion der transferten Zellen, so zeigten sich zwei verschiedene Trends. Wurde CD28 vor der Primärantwort entfernt, so zeigte sich eine erhöhte Frequenz an degranulierenden und IFN- γ produzierenden Zellen innerhalb der transferten Zellen. Dieser Trend zur verstärkten Effektorfunktion in Abwesenheit von Kostimulation wurde auch zuvor bei der Analyse der Primärantwort beobachtet. Gedächtniszellen hingegen, in denen vor der Sekundärantwort CD28 deletiert wurde, zeigten weder verstärkte noch abgeschwächte Effektorfunktionen bezüglich Degranulation und IFN- γ Produktion (Abb. 22C, D). Mit diesen Transfereperimenten wurden somit die Ergebnisse der globalen Deletion von CD28 und die Daten der Blockadeexperimente, die ergaben, dass die

Effektorfunktion durch Wegnahme der Kostimulation nicht beeinträchtigt wird, bestätigt.

Bei der weiteren phänotypischen und Transkriptionsfaktoranalyse der transferierten Effektorzellen wurden diese Ergebnisse gefestigt. So wurde lediglich in transferierten Zellen, welche vor der Primärantwort deletiert wurden, eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors T-bet gegenüber der Kontrollgruppe (ÖI) festgestellt, während eine Deletion von CD28 in Gedächtniszellen vor der Sekundärantwort keinen Einfluss auf die Expression von T-bet nahm (Abb. 23B). Die Analyse der Subpopulationen EEC, DPEC, SLEC und MPEC belegte, dass bei der Sekundärinfektion in allen drei Gruppen stabile Effektorzellpools gebildet wurden. In gleichem Maße, in dem CD127 herunterreguliert wurde, wurde KLRG-1 exprimiert, was die Bildung reiner stabiler Population an Effektoren belegt (Abb. 23A).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Unterbrechung der Kostimulation zu einer starken Beeinträchtigung der primären und sekundären Immunantworten führte. Effektoren proliferierten in geringerem Maße und bildeten einen kleineren Effektorzellpool, wohingegen die Effektorfunktion nur durch CD28 Deletion vor der Primärantwort verstärkt wurde.

4.2.4 Selektive Deletion von CD28 am Höhepunkt der Primärantwort hat keinen Einfluss auf die Entwicklung und den Abruf des Gedächtnisses

Die bisherigen Daten zeigen deutlich, dass Primär- und Sekundärantwort durch Kostimulation verstärkt werden. Nachdem bisher die direkten Effektorantworten ausführlich analysiert wurden, wird in den folgenden Experimenten dem Einfluss von CD28 auf die Etablierung des Gedächtnisses auf den Grund gegangen. Um dies zu untersuchen, wurden mit Hilfe des Zelltransfersystems geeignete Experimente durchgeführt. Dazu wurden nach Transfer von 1000 OT-I Thy1.1 iCD28ko Zellen und einer niedrig dosierten Primärinfektion CD28 am Höhepunkt der Primärantwort durch Behandlung mit Tamoxifen deletiert (Tag 6-10). Die Wahl dieses Zeitpunktes der Deletion ermöglicht die Aktivierung transferierter Zellen in Anwesenheit von Kostimulation und erlaubt die genaue Analyse des Einflusses von CD28 Signalen auf die Kontraktionsphase (bis Tag 19) sowie die Etablierung des Gedächtnisses (Tag 90). Ebenso wurde die Reaktivierung der Gedächtniszellen am Tag 5 nach der Sekundärinfektion (boost, Tag 93) analysiert (Versuchsaufbau siehe Abb. 24).

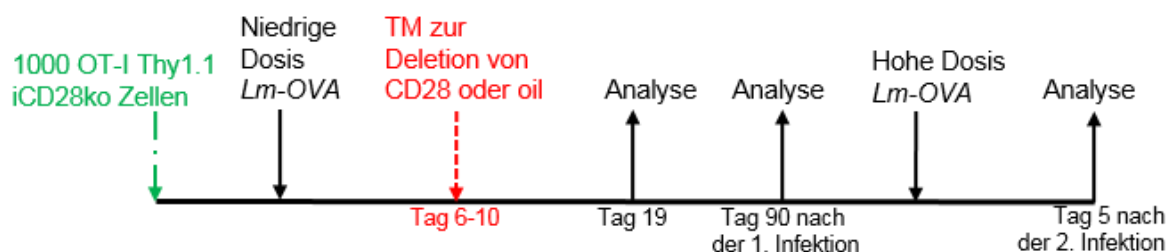


Abbildung 24: Versuchsaufbau zur Beobachtung und Analyse von Gedächtniszellen

Die Analyse der Anzahl der transferierten Zellen zeigte weder während der Kontraktionsphase der Primärantwort (Tag 19), noch in der Erhaltungsphase des Gedächtnisses (Tag 90) oder bei Reaktivierung einen Unterschied bezüglich des Anteils der transferierten Zellen und deren absoluter Anzahl pro Milz bei CD28 Deletion bzw. intakter Kostimulation (Abb. 25A). Für die Etablierung des Gedächtnisses spielte Kostimulation also eine unbedeutende Rolle. Dies wurde durch die Analyse der Effektorfunktionen der Gedächtniszellen bestätigt. Weder an Tag 19 noch an Tag 90 wurde Degranulation oder IFN- γ Produktion der transferierten Zellen durch CD28 Deletion verändert (Abb. 25B, C).

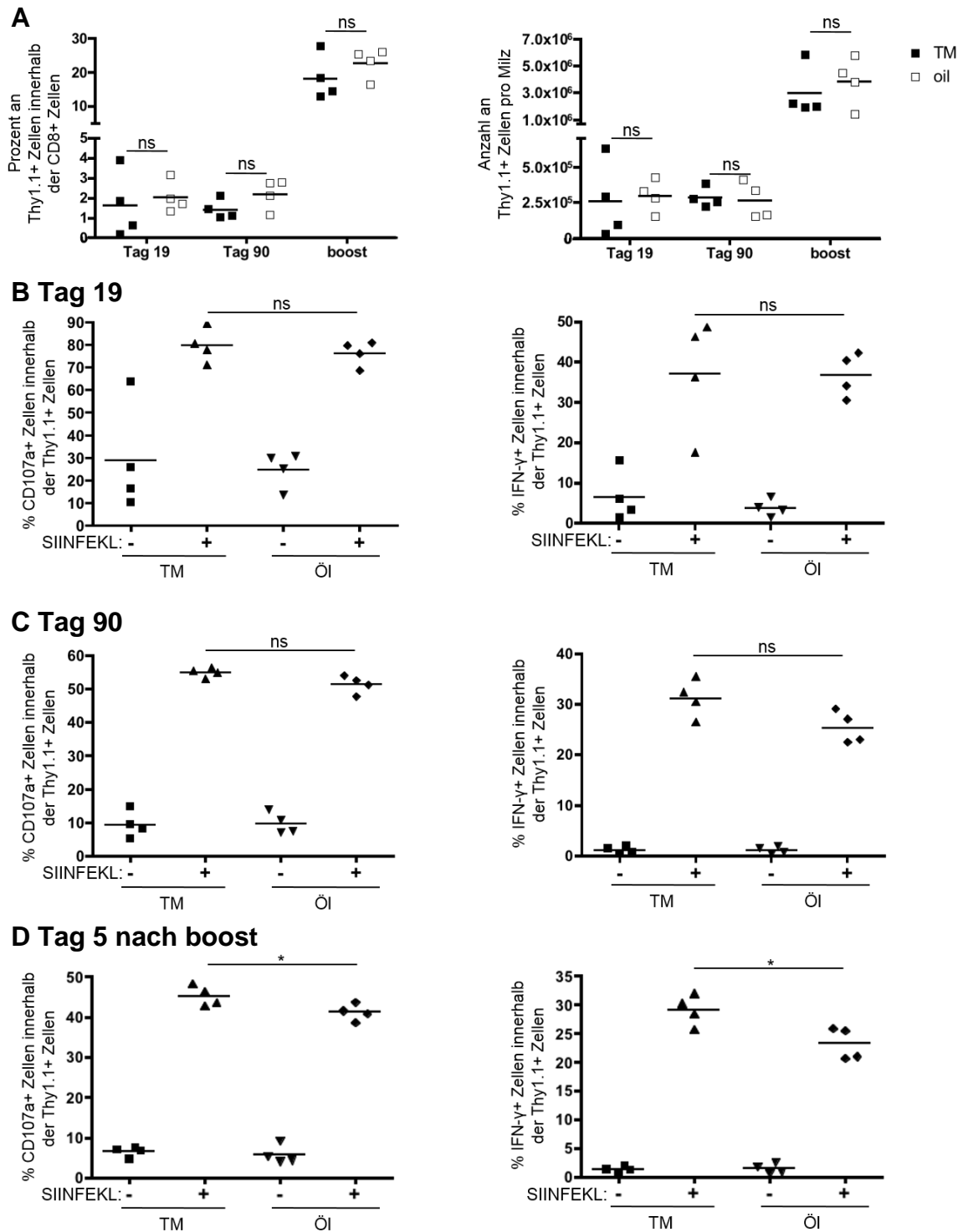


Abbildung 25: Expansion und Effektorfunktion von Gedächtniszellen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Primärinfektion. Milzzellen Listerien infizierter Mäuse, welche an Tag 6 bis 10 der Primärantwort mit Tamoxifen behandelt wurden, um CD28 in transferierten Zellen zu deletieren, wurden auf den Anteil transferierter Thy1.1 positiver Zellen innerhalb der CD8 Zellen und die Anzahl transferierter Thy1.1 positiver Zellen pro Milz analysiert (A), sowohl 19 und 90 Tage nach Primär-, als auch 5 Tage nach Sekundärinfektion. Weiterhin wurden zu den drei Analysezeitpunkten (Tag 19, B, Tag 90 C und Tag 5 nach boost, D) Milzzellen *in vitro* mit Antigen SIINFEKL für 5 h stimuliert und auf Degranulation (links) und IFN- γ Produktion (rechts) untersucht. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

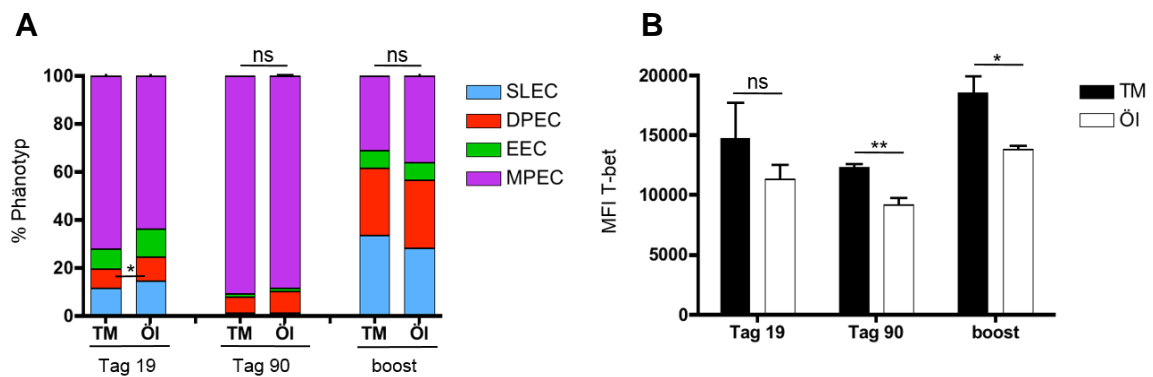


Abbildung 26: Phänotypisierung transferierter Gedächtniszellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Primärinfektion. Transferierte Zellen nach CD28 Deletion (TM) bzw. Kontrollbehandlung (ÖI) an Tag 6 bis 10 der Primärinfektion wurden aufgrund der CD127 und KLRG-1 Expression in Effektor- und Gedächtnisvorläuferstypen eingeteilt und der Phänotyp der transferierten Zellen an Tag 19 und Tag 90 nach der Primärantwort sowie Tag 5 nach der Sekundärantwort bestimmt (A). Weiterhin wurde der MFI der T-bet Expression in transferierten Zellen an den verschiedenen Analysezeitpunkten durch intrazelluläre FACS Färbung ermittelt (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4 Mäusen. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied.

Auch wenn die Expansion und die Effektorfunktionen der CD8 Gedächtniszellen durch die Deletion von CD28 am Höhepunkt der Primärantwort nicht beeinflusst wurde, hatte das Ausbleiben der Kostimulation Auswirkungen auf die Gedächtniszellen. Bei der Analyse des Phänotyps zeigte sich eine reduzierte Expression von KLRG-1 durch einen geringeren Anteil DPEC und EEC am Tag 19 nach Primärinfektion in CD28 deletierten Zellen. Bis Tag 90 verschwand dieser Unterschied, denn im etablierten Gedächtnis überwogen CD8 T-Zellen, welche CD127 exprimieren, und negativ bezüglich KLRG-1 sind, es liegen also ausdifferenzierte Gedächtniszellen vor (Abb. 26A). Ein weiterer Unterschied zwischen CD28 deletierten und suffizienten Gedächtniszellen stellte sich bei der Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors T-bet heraus. Nach Deletion war dessen Expression signifikant erhöht und sowohl vor als auch nach Reaktivierung der Gedächtniszellen (Abb. 26B). Diese erhöhte Expression korrelierte mit der Effektorfunktion der Zellen, denn die CD28 deletierten, transferierten Zellen zeigten eine Tendenz hin zu verstärkter Degranulation und INF- γ Produktion (Abb. 25D).

Bezüglich der Etablierung und Erhaltung des Gedächtnisses lässt sich somit eine untergeordnete Rolle der Kostimulation schlussfolgern. CD8 Zellen scheinen sich an den defizienten Phänotyp zu adaptieren, denn sie zeigten erstaunlicherweise bei Reaktivierung eine Expansion vergleichbar mit CD28 suffizienten Zellen, wenn die Deletion nicht unmittelbar vor der Sekundärantwort stattfand.

5 Diskussion

In dieser Doktorarbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Einfluss von CD28 auf Immunantworten von CD8-T-Gedächtniszellen auf zellintrinsic Effekten beruht. Mit dem entwickelten Transfersystem, das die Deletion von CD28 zu einem bestimmten Zeitpunkt und nur in einer Teilpopulation der CD8 T-Zellen ermöglicht und so die Immunreaktion in einem sonst intakten Immunsystem ablaufen lässt, konnten klare Beweise für die entscheidende Rolle von CD28 vermittelter Kostimulation auf die Stärke von primären und sekundären Immunantworten gegen Lm-OVA gewonnen werden.

Diese Daten werden unterstützt durch die Ergebnisse der CD28 Blockade- sowie der globalen Deletionsexperimente, die zu gleichen Schlussfolgerungen führten, nämlich dass das Ausbleiben von Kostimulation die Expansion der Effektorzellen einschränkt. Mit diesen letztgenannten Systemen konnte jedoch nicht geklärt werden, ob der Einfluss der Kostimulation auf zellintrinsic Ebene ausgeübt wird. Vielmehr illustrierte das Experiment der Deletion am Höhepunkt der Primärantwort (Kap.4.2.4) die Plastizität des Immunsystems. Hier lässt sich eine funktionelle Adaptation der Gedächtniszellen an den deletierten Phänotyp ableiten, denn diejenigen CD8 T-Gedächtniszellen, welche 3 Monate nach Deletion reaktiviert wurden, expandierten im gleichen Maße wie CD28 heterozygote Lymphozyten. Auch kann dieser lang zurückliegende Deletionszeitpunkt zu einer Selektion bestimmter CD28 unabhängiger Klone geführt haben. Diese beobachtete Adaptation an einen CD28 defizienten Phänotyp ist von Bedeutung für Daten und Ergebnisse, welche mit CD28 knockout Mäusen bzw. Transfer von CD28 knockout Zellen gewonnen wurden. Dieser Gesichtspunkt muss bei der Analyse und Auswertung älterer Arbeiten klar berücksichtigt werden (siehe 1.4).

CD28 trägt je nach Kontext und Zelltyp, auf dem der Rezeptor exprimiert wird, zu pro- oder antiinflammatorischen Reaktionen bei. Die proinflammatorische Wirkung wurde in dieser Arbeit ausführlich im Kontext cytotoxischer T-Zell-Antworten untersucht, wohingegen die antiinflammatorische Wirkung durch regulatorische T-

Zellen nur im Zusammenhang der globalen Blockadeexperimente eine Rolle spielte. Generell sind T_H2 -vermittelte Immunantworten stärker anfällig bezüglich der Unterbrechung kostimulatorischer Signale (Shahinian, Pfeffer et al. 1993, Padrid, Mathur et al. 1998) und ein Ausbleiben kostimulatorischer Signale kann Autoimmunreaktionen verhindern (Kimzey, Liu et al. 2004, Gogishvili, Luhder et al. 2012). T_{reg} -Zellen sind ebenso stark abhängig von Kostimulation und eine Deletion von CD28 führt zu einer drastischen Verringerung ihrer Anzahl (Gogishvili, Luhder et al. 2013). Der unterdrückende Einfluss der regulatorischen Zellen auf die Gedächtnisantwort im Listerienmodell (Kursar, Kohler et al. 2004) wurde in dieser Arbeit analog zu Experimenten von Kursar et al. nachgewiesen. So konnte durch Deletion der CD4-Zellen eine stärkere Expansion antigenspezifischer cytotoxischer T-Zellen ausgelöst werden – im Vergleich zu Immunantworten in Anwesenheit der CD4 T-Zellen (Kap. 4.1.4), welche auch bei Blockade der Kostimulation erhalten blieb. Dies kann durch das Ausbleiben der proliferationshemmenden Funktionen regulatorischer T-Zellen erklärt werden. Somit wurde zugleich eine zellintrinsische Rolle der Kostimulation für die CD8 T-Zellen als auch eine Beteiligung regulatorischer T-Zellen an der Kontrolle der Expansion der Effektorzellen nachgewiesen. Diese nicht zu unterschätzende Rolle der regulatorischen T-Zellen muss bei Datensätzen, die mit globalen CD28 knockout Mäusen oder globaler Blockade von CD28 erhoben wurden, bedacht werden.

Im Gegensatz zu der klaren Einschränkung der Expansion antigenspezifischer Zellen durch ausbleibende kostimulatorische Signale zeichnet sich bezüglich der Beeinflussung der Effektorfunktionen ein komplexeres Bild ab. Wurde nach globaler Beeinträchtigung der Kostimulation während der Sekundärantwort eine verminderte Effektorfunktion der antigenspezifischen CD8 Gedächtniszellen nachgewiesen, so ergab sich bei Deletion von CD28 in ausschließlich transferierten, antigenspezifischen Zellen ein Trend hin zu einer verstärkten Effektorantwort. Diese zunächst widersprüchlich wirkenden Ergebnisse können durch die Einbeziehung anderer Komponenten des Immunsystems aufgelöst werden. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass die Effektorantwort der CD8 Zellen durch weitere CD28 abhängige Zellpopulationen beeinflusst wird. Nicht nur

regulatorische T-Zellen, wie unter 4.1.4 untersucht, welche sowohl Proliferation, als auch die Effektorfunktionen einschränken können, sondern auch die Vielzahl der T_H-Subpopulationen haben Einfluss auf Effektorzellen. Weiterführend muss im Zusammenhang mit den Effektorfunktionen auch der Effektorphänotyp der cytotoxischen T-Zellen betrachtet werden. Entgegen der verstärkten Effektorfunktion waren Gedächtniszellen, denen vor der Primärantwort CD28 deletiert wurde, trotz erhöhter T-bet Expression phänotypisch weniger in Richtung voll funktioneller Effektorzellen ausgereift. Eine ähnliche Entkopplung der phänotypischen CD8-T-Zell Differenzierung nach primärer Infektion von Kostimulation wurde schon im viralen Modell beobachtet. Hier exprimierten antivirale CD8 Effektorzellen erhöhte Mengen an CD127 und CD62L im Vergleich zu wildtypischen Zellen (Eberlein, Davenport et al. 2012). Bei der Betrachtung der Effektorfunktionen muss weiterhin berücksichtigt werden, dass nicht die tatsächliche Effektorfunktion *in vivo* gemessen wurde, sondern die Kapazität, Effektorfunktionen nach *in vitro* Restimulation auszuüben. So könnten Zellen mit einem weniger ausgeprägten Aktivierungsphänotyp stärker auf *ex vivo* Restimulationssignale antworten, da sie über weniger ausgeschöpfte Stoffwechselkapazitäten verfügen. Somit kann trotz weniger ausdifferenziertem Phänotyp eine verstärkte Effektorfunktion *in vitro* erklärt werden.

Zur Analyse der Effektorfunktionen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Protokoll entwickelt, dass die Detektion der Effektorfunktionen bei gleichzeitiger Analyse der T-Zell-Rezeptorspezifität erlaubt. Bisher war es nicht möglich, T-Zellen *in vitro* zu stimulieren und gleichzeitig T-Zell-Rezeptoren mit MHC-Tetrameren zu färben, da es aufgrund der spezifischen Antigen-Rezeptor-Wechselwirkung zur Modulation des T-Zell-Rezeptors kommt, ein Prozess, bei dem die Expression des TZR auf der Zelloberfläche herunterreguliert wird (Escors, Bricogne et al. 2011). Nach üblichen Stimulationsprotokollen, bei denen CD8 T-Lymphozyten über Nacht in Anwesenheit des Antigens stimuliert werden (siehe Abb. 5) kann mit Streptameren® die Anwesenheit der TZR auf der Zelloberfläche nicht mehr nachgewiesen werden. Mit ELISPOT-Experimenten können zwar auf sehr sensible Art IFN- γ Produzenten nachgewiesen werden, jedoch nur innerhalb der aufgereinigten CD8 T-Zellen und nicht innerhalb der antigenspezifischen

Effektorzellpopulation. Um eine Aussage über Anteil an CD8 Zellen mit Effektorfunktion auf antigenspezifischer Ebene zu machen, kann das Verhältnis von IFN- γ Produzenten zu antigenspezifischen Zellen herangezogen werden (Vgl. Abb. 5). Durch die Verhältnisbildung kann jedoch nur eine indirekte Schlussfolgerung über die Häufigkeit antigenspezifischer Zellen mit Effektorfunktion gezogen werden. Um diese Problematiken zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt, das die Detektion antigenspezifischer CD8 T-Zellen nach Antigenstimulation und gleichzeitig die Analyse der Effektorfunktionen ermöglicht. Die Stimulation sowie der Nachweis eines intrazellulären Zytokins sowie von CD107a als Degranulationsmarker wurde leicht abgewandelt nach dem Protokoll von Ruitenberg et al. durchgeführt (Ruitenberg, Ghanekar et al. 2007). Neu entwickelt wurde die Färbung der antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren nach der *in vitro* Stimulation. Entscheidend für die erfolgreiche Detektion der T-Zell-Rezeptoren auf den stimulierten Zellen sind eine kurze, vierstündige Inkubationsperiode mit anschließender extra- und intrazellulärer FACS Färbung sowie eine FACS Analyse mit peniblen Kompensationseinstellungen und Auswertestrategien. Abbildung 27 zeigt exemplarisch die Gating Strategie zur Analyse der Effektorfunktion antigenspezifischer CD8-Lymphozyten vor und nach Restimulation. In Anwesenheit von SIINFEKL zeigt sich sowohl in CD28 deletierten (TM) als auch CD28 suffizienten Zellen (ÖI) eine geringere Expression des TZR auf der Zelloberfläche (Reihe 3 und 6). Die Modulation des TZR lässt sich hier direkt beobachten, ist jedoch nur soweit fortgeschritten, dass die Zellen mit SIINFEKL-spezifischen Rezeptoren gerade noch identifiziert werden können. So können durch entsprechendes Setzen der Gates die H-2Kb SIINFEKL-positiven Zellen identifiziert und auf Effektorfunktionen hin analysiert werden. Dieses neu entwickelte Protokoll eignet sich somit zur zeitgleichen Analyse der T-Zell-Rezeptorexposition auf der Zelloberfläche und der Effektorfunktion nach *in vitro* Restimulation mit Antigen und umgeht die bisherige Problematik der Modulation der T-Zell-Rezeptoren bis unter die Nachweisgrenze.

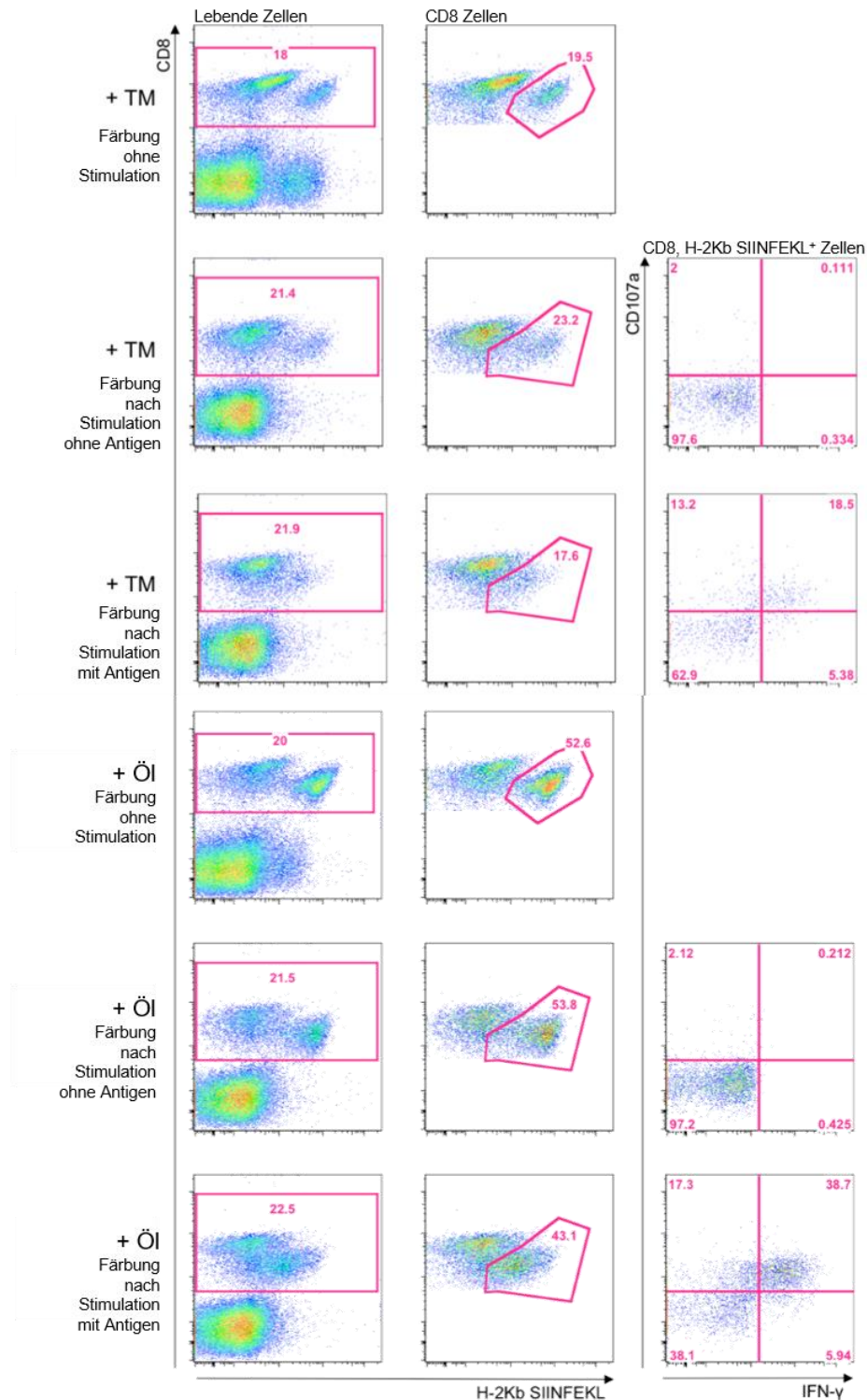


Abbildung 27: Analysestrategie der Effektorfunktionen *in vitro* restimulierter, antigenspezifischer CD8 T-Zellen. Nach vierstündiger Inkubation in Anwesenheit von SIINFEKL (Reihe 3 und 6) wurden T-Zellen auf Anwesenheit des SIINFEKL-spezifischen T-Zell- Rezeptors und IFN- γ Produktion bzw. CD107a Exposition getestet. Zur Kontrolle dienten Zellen, welche das gleiche Stimulationsprozedere in Abwesenheit von Antigen durchliefen (Reihe 2 und 5). Zur Vergleichbarkeit der Frequenz antigenspezifischer Zellen vor der Restimulation sind die Ergebnisse der direkten *ex vivo* Färbung (Reihe 1 und 4) gezeigt. Reihe 1-3 zeigt Zellen, von denen CD28 durch Tamoxifengabe deletiert wurde (TM), Reihe 4-6 CD28 suffiziente Kontrollzellen (ÖI).

Es ist bekannt, dass eine Behinderung der Kostimulation während der Primärantwort zu einer Einschränkung des Effektorpools der Primärantwort und zu einer reduzierten Gedächtnispopulation führt (Fuse, Zhang et al. 2008). Bisher wurde jedoch nicht der Einfluss der Kostimulation nach Aktivierung der naiven T-Zellen auf deren Entwicklung zu Gedächtniszellen und deren Reaktivierungspotential analysiert. Mit den Blockadeexperimenten, bei denen mit Hilfe von E18 Behandlung kostimulatorische Signale global während der Primärantwort bzw. während der Etablierung des Gedächtnisses blockiert wurden, wurde ein Nachweis für die Unabhängigkeit der Entwicklung der Gedächtniszellen von CD28 vermittelten Signalen gebracht, denn trotz langanhaltender Blockadeperiode wurde die Größe des Effektorzellpools nach Reexpansion nicht beeinflusst. Erstaunlicherweise konnte auch mit dem Transfersystem von iCD28ko Zellen bei einer Deletion von CD28 von aktivierten Effektorzellen am Höhepunkt der Primärantwort keine Einschränkung der Sekundärantwort beobachtet werden. Zur Interpretation der von CD28-Blockade unabhängigen Resultate können verschiedene Erklärungsansätze herangezogen werden. Generell ist das Entwicklungsschicksal der aktivierten CD8 T-Lymphozyten zum Höhepunkt der Primärantwort bereits festgelegt (Zhang, Byrne et al. 2007), sodass ausbleibende kostimulatorische Signale zu diesem späten Zeitpunkt der Immunantwort kaum Auswirkungen haben. Die Etablierung und Erhaltung der Gedächtniszellen wird vor allem durch Signale über IL-7 und IL-15 gesteuert (Williams and Bevan 2007) und weniger über Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen. Nach Abbau blockierender Antikörper lagen die CD28 Moleküle bei der anschließenden Reinfektion frei vor, sodass die uneingeschränkt ablaufende Immunantwort nach transienter CD28 Blockade ab dem Höhepunkt der Primärantwort (Abb. 12C, D) erklärt werden kann. Die CD28 Blockade während der kompletten Primärantwort führte allerdings auch zu einer Sekundärantwort, die unabhängig von der vorangehenden CD28 Blockade ablief. Zur Erklärung muss ein weitere Hypothese herangezogen werden. Einerseits kann durch Selektion bestimmter CD28 unabhängigerer Klone während des langen Blockadezeitraums eine uneingeschränkte Sekundärantwort ermöglicht werden. Zudem ist die Frequenz antigenspezifischer Gedächtniszellen vor Reinfektion nicht bekannt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch Blockade von CD28 weniger Gedächtniszellen gebildet wurden. Mögliche Unterschiede in den

Gedächtnispopulationen könnten aufgrund der extremen Proliferation der antigenspezifischen Klone während der Sekundärantwort nicht mehr nachweisbar sein – zumindest nicht mehr am Tag 5.

Die Daten, welche zur Analyse der Rolle von CD28 für die Etablierung des immunologischen Gedächtnisses mit dem Transfersystem von antigenspezifischen, deletierbaren CD8 T-Zellen erhoben wurden, belegen jedoch, dass die Anzahl antigenspezifischer CD8 Gedächtniszellen nicht durch Deletion von CD28 am Höhepunkt der Primärantwort verändert wurde (4.2.4). Reiften die Gedächtniszellen – trotz CD28 Deletion – in einem CD28 suffizienten Immunsystem heran, so unterschied sich Größe der Gedächtniszellpopulation nicht von CD28 heterozygoten, transferierten Zellen. Im Gegensatz zu den Blockadeexperimenten lief in diesem Setting die Sekundärantwort ohne CD28 Signale ab, denn CD28 wurde in den transferierten, antigenspezifischen Zellen unwiderruflich von der Zelloberfläche deletiert. Nichts desto trotz lief die Sekundärantwort uneingeschränkt ab, ganz im Gegensatz zu den Experimenten, bei denen CD28 direkt vor der Sekundärantwort deletiert wurde (siehe 4.2.3). Der Zeitraum zwischen Erst- und Zweitinfektion (hier etwa 90 Tage) scheint Einfluss auf die CD28 Sensibilität während der Sekundärinfektion zu haben. In bisher unveröffentlichten Daten von Dr. Dirk Homann wurden ähnliche Phänomene beobachtet, nämlich dass der Zeitraum zwischen Bildung und Reaktivierung der Gedächtniszellen die CD28 Abhängigkeit der antiviralen CD8 Effektor-T-Zell Reaktivität beeinflusst. Er hingegen beobachtete eine graduelle Zunahme der Abhängigkeit von CD28 Kostimulation je mehr Zeit nach Generierung der Gedächtniszellen verstrichen war (van der Heide and Homann 2016). Das Alter der Gedächtniszellen ist ein weiterer – nicht zu unterschätzender – Parameter, der die Abhängigkeit von kostimulatorischen Signalen verändern kann. So müssen Experimente mit unterschiedlichem zeitlicher Verlauf getrennt interpretiert werden.

Im Zusammenhang mit den unterschiedlichen experimentellen Settings und Ergebnissen muss weiterhin berücksichtigt werden, dass es nicht nur ein kostimulatorisches Signal, vermittelt durch CD28, auf T-Zellen gibt. Inzwischen sind über 4000 inhibitorische und stimulierende Signalmoleküle der Zelloberfläche bekannt (Zhu, Yao et al. 2011). sodass eine Vielzahl an Signalen bei Aktivierung

einer Zelle integriert werden. Verschiedene zusätzliche kostimulatorische Prozesse könnten ein Fehlen von CD28 vermittelten Signalen kompensieren.

Nicht nur im Kampf gegen verschiedene Autoimmunerkrankungen ist CD28 ein wichtiger Angriffspunkt für Therapien, auch im Kampf gegen Tumore ist eine intakte Kostimulation von höchster Bedeutung. Viele Krebsmedikamente haben geplante oder positive „Nebenwirkungen“ auf das Immunsystem (Galluzzi, Senovilla et al. 2012). Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass das seit den 70er Jahren in der Krebstherapie eingesetzte Medikament Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin; DDP), neben der bekannten Wirkung der Störung der DNA-Replikation zu einer verstärkten Infiltration antigenpräsentierender Zellen in das Tumorgewebe führt (Beyranvand Nejad, van der Sluis et al. 2016). Diese exprimieren erhöhte Mengen an kostimulatorischen Liganden wie CD80/86 und CD70, wodurch Tumor-spezifische CD8 T-Zellen optimal aktiviert werden und den Tumor beseitigen. In CD80/86 defizienten Mäusen kann Cisplatin aufgrund der fehlenden Aktivierung cytotoxischer CD8 T-Zellen nicht wirken und die Mäuse erliegen dem Tumor, wohingegen eine CTLA-4 Blockade die Antitumoraktivität erhöht. Eine weitere Herangehensweise in der Tumorthherapie ist eine Behandlung mit PD-1 Inhibitoren, wodurch Tumore, welche den Ligand PD-L1 exprimieren, weniger gut das Immunsystem unterdrücken können und zwar in Kombination mit CTLA-4 Blockade (Das, Verma et al. 2015). CTLA-4 wie PD-1 dämpfen die Immunreaktion von T-Lymphozyten, jedoch auf unterschiedliche Weise. Die Unterdrückung der PD-1 Signale führt zu einer Umkehr der Inaktivierung vieler Gene, die für die lytische Funktion und Sekretion von Granula von NK und CD8 T-Zellen kodieren. CTLA-4 Blockade hingegen aktiviert Zellzyklus-regulierende Gene wie Ki-67 in transitorischen Gedächtniszellen und führt zu Reaktivierung dieser. An diese Thematik anknüpfend wurde in einer aktuellen Studie die synergistische Wirkung von CD28 Kostimulation und PD-L1/PD-1 Blockade im Mausmodell wie auch bei Krebspatienten deutlich gezeigt (Kamphorst, Wieland et al. 2017). Bei chronischen Infektionen oder Tumoren kommt es häufig zu einer „Erschöpfung“ der T-Zellen, welche durch verminderte Effektorfunktionen und Expression von immunrepressiven Rezeptoren gekennzeichnet ist (Wherry 2011). Kamphorst et al. verwendeten ein chronisches LCMV Infektionsmodell und

zeigten, dass unter PD-L1 Blockade Effektorfunktion und Proliferation (Ki-67) der „erschöpften“ CD8 T-Zellen zunahm – und zwar abhängig von CD28 vermittelter Kostimulation. Sowohl CD80/86 Blockade als auch CD28knockout unterdrückten den immunstimulatorischen Effekt der PD-L1 Blockade und der überzeugende Beweis, dass CD28 eine zellintrinsische Rolle in den erschöpften CD8 T-Zellen spielt, wurde - wie in dieser Doktorarbeit – über eine Tamoxifen-induzierte konditionelle CD28 Deletion gebracht. Weiterhin ergab die Analyse des Blutes von Lungenkrebspatienten, welche positiv auf die PD-1 Therapie reagierten, einen Anstieg der CD28 Expression in CD8 Effektorzellen. An diesem aktuellen Beispiel zeigt sich deutlich, welche Bedeutung die Erforschung der CD28 Kostimulation im murinen Modell nach wie vor besitzt und welche therapeutischen Fortschritte durch die Forschung erlangt wurden und werden. So trägt das Wissen um die Bedeutsamkeit der Kostimulation für effektive CD8 Effektor-Gedächtniszellantworten dazu bei, bei Krebspatienten gezielt effektive und langanhaltende T-Zell-Reaktionen hervorzurufen, welche Tumore bekämpfen, bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten die gegen den Körper gerichteten T-Lymphozyten zu unterdrücken und bei Transplantationspatienten die Organabstoßung zu verhindern.

Bilderverzeichnis

- Abbildung 1: Einteilung aktivierter CD8 Lymphozyten in Subpopulationen 16
- Abbildung 2: Versuchsaufbau zur globalen Deletion von CD28 vor der
Sekundärantwort 51
- Abbildung 3: Nachweis der Deletion von CD28. Milzzellen wurden an Tag 5 nach
der Sekundärinfektion mit anti-Maus CD8 und anti-Maus CD28
Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert und
ausgewertet. Die Dot Plots einer CD28 deletierten (iCD28ko + TM),
einer kontrollbehandelten (iCD28ko + Öl) und einer wildtypischen Maus
(B6) zeigen die Gating Strategie vom FSC/SSC Gate auf die CD8
positiven Zellen und deren CD28 Expression. Das obere Histogramm
zeigt die Überlagerung der CD28 Expression der CD8 Zellen dieser 3
Mäuse. Das untere Histogramm zeigt die CD28 Expression von
Lymphknotenzellen verschiedener Linien, welche nach Tamoxifen- bzw.
Ölbehandlung gefärbt wurden. 52
- Abbildung 4: Nachweis Antigen spezifischer Effektorzellen nach Sekundärinfektion
mit bzw. ohne vorheriger CD28 Deletion. (A) Gating Strategie vom Live-
Gate zu CD8 positiven und Tetramer positiven (H-2Kb SIINFEKL+)
Zellen für CD28 deletierte (TM) und CD28 suffiziente (Öl) Milzzellen. (B)
Prozent antigenspezifischer Zellen innerhalb CD8 positiver Milzzellen
und absolute Anzahl antigenspezifischer Zellen pro Milz. (C) Prozent
antigenspezifischer Zellen der CD8 Zellen der Milz im Verlauf der
Infektion. (D) Kolonie-formende Einheiten (CFUs) der Leber im Verlauf
der Sekundärinfektion. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4-5
Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Für C wurden die Daten
von 8 Experimenten gepoolt, die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von
3-10 Mäusen. Für D wurden 7 Mäuse pro Zeitpunkt analysiert.
Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein
signifikanter Unterschied. 53
- Abbildung 5: Nachweis der IFN- γ Produktion Antigen-stimulierter Milzzellen. (A)
Milzzellen CD28 suffizienter (Öl) oder deletierter (TM) Mäuse wurden
über Nacht mit bzw. ohne SIINFEKL kultiviert und intrazellulär auf IFN- γ

Produktion gefärbt. Die IFN- γ Produzenten wurden in Verhältnis zu den antigenspezifischen Zellen innerhalb der CD8+ Zellen gesetzt. (B) Für ELISPOT Experimente wurden Milzzellen CD28 suffizienter (ÖI) oder deletierter (TM) Mäuse über Nacht mit bzw. ohne SIINFEKL kultiviert und entwickelt. Die positiven Spots wurden ebenfalls in Verhältnis zu antigenspezifischen Zellen gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 55

Abbildung 6: Degranulationsassay zur Bestimmung der IFN- γ Produktion sowie CD107a Exposition antigenspezifischer Milzzellen. (A) FACS-Plot antigenspezifischer Milzzellen bezüglich CD107a Exposition und IFN- γ Produktion unstimuliert, sowie nach SIINFEKL Stimulation. (B). CD107a+ sowie IFN- γ + Milzzellen CD28 suffizienter (ÖI) bzw. deletierter (TM) Mäuse nach Antigenstimulation. Die Daten zeigen die Mittelwerte von zwei gepoolten Experimenten mit jeweils 4-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 56

Abbildung 7: Auswirkung der Tamoxifenbehandlung auf die Immunantwort von CD28 heterozygoten⁻ Mäusen. CD28^{+/-} Mäuse wurden vor der Sekundärinfektion mit Tamoxifen behandelt und dessen Auswirkung auf die Gedächtnisimmunantwort untersucht. (A) Anteil an CD8, CD4 und regulatorischen (Foxp3+, CD25+) Zellen innerhalb der verschiedenen Organe nach Tamoxifen (TM) bzw. Kontrollbehandlung (ÖI). (B) Anteil an antigenspezifischen Zellen innerhalb der CD8+ Population in den verschiedenen Organen und Anteil der IFN- γ Produzenten innerhalb der CD8+ Population nach über Nacht Stimulation mit Antigen von Tamoxifen behandelten (TM) und Kontrolltieren (ÖI). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 3 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 58

Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Blockade von CD28 mit E18 während der Sekundärinfektion..... 59

- Abbildung 9: Expansion und Effektorfunktion antigenspezifischer CD8 Zellen während der Sekundärinfektion unter CD28 Blockade mit E18. Am Tag 5 nach der Sekundärinfektion mit bzw. ohne CD28 Blockade durch E18 wurden antigenspezifische Zellen mittels Streptamer® Färbung nachgewiesen. Dargestellt sind Prozente antigenspezifischer Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) in verschiedenen Organen von wildtypischen (control) oder CD28 blockierten (E18) Mäusen. (C) Milzzellen E18 behandelter bzw. von Kontrollmäusen wurden *in vitro* in Anwesenheit von SIINFEKL für 5h restimuliert und die Effektorfunktion antigenspezifischer Zellen durch CD107a Exposition (C) und IFN- γ Produktion (D) nachgewiesen. Die Daten zeigen die Mittelwerte von zwei gepoolten Experimenten mit jeweils 4-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 60
- Abbildung 10: Versuchsaufbau zur Blockade von CD28 mit E18 während der Primärantwort (A) und Etablierung des Gedächtnisses (B) 61
- Abbildung 11: Nachweis von E18 auf der Zelloberfläche der PBMCs und im Serum E18 behandelter Mäuse. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Primärinfektion wurden E18 behandelten und unbehandelten Tieren Blut entnommen. Das Serum wurde aufbereitet, mit Lymphozyten einer wildtypischen Maus inkubiert und die Bindung von Mausantikörpern an die Zelloberfläche mit PE konjugiertem Esel anti-Maus Immunglobulinen nachgewiesen (Grafik 1-3). PBMCs wurden isoliert und an deren Oberfläche gebundener Antikörper wurde direkt durch Esel anti-Maus Färbung nachgewiesen (Grafik 4). 61
- Abbildung 12: Expansion und Effektorfunktion antigenspezifischer Zellen während der Sekundärantwort nach transientser CD28 Blockade während der Primärantwort (A, B) oder der Etablierung des Gedächtnisses (C, D). An Tag 5 nach Sekundärinfektion wurden antigenspezifische Zellen der Milz, der Mesenteriallymphknoten und der PBMCs mittels Streptamerfärbung® (A,C) und IFN- γ Produzenten nach Restimulation der Milzzellen mit Antigen durch Intrazellulärfärbung (B, D) nachgewiesen. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 3-4 Mäusen, jeder

- Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied..... 62
- Abbildung 13: Versuchsaufbau zur Blockade von CD28 und Deletion der CD4 T-Zellen (4 Gruppen: E18 Blockade, CD4 Deletion, CD3 Deletion + E18 Blockade, Kontrollgruppe) 64
- Abbildung 14: Expansion und Effektorfunktion antigenspezifischer Zellen während der Sekundärantwort, bei welcher CD4 Zellen deletiert wurden und/oder zusätzlich Kostimulation geblockt wurde. Am Tag 5 nach Sekundärinfektion, welche unter CD28 Blockade (E18), Deletion der CD4 Zellen (GK1.5), unter CD28 Blockade und Deletion der CD4 Zellen (GK1.5+E18) oder ohne Intervention (control) ablief, wurden H-2K^b/SIINFEKL⁺ Zellen mithilfe von Streptamer® Reagenz nachgewiesen. Der Anteil antigenspezifischer Zellen innerhalb der CD8 Zellen der Milz (A) und deren absolute Zellzahl pro Milz (B) sind dargestellt. Milzzellen wurden für 5 h *in vitro* mit Antigen restimuliert und die Effektorfunktion bezüglich Degranulation mittels CD107a Exposition (C) und IFN- γ Produktion (D) nachgewiesen. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 65
- Abbildung 15: Versuchsaufbau zum Experiment Titration der OT-I Thy1.1 iCD28ko Zellen..... 67
- Abbildung 16: Expansion der transferierten und endogenen antigenspezifischen Zellen nach Primär- und Sekundärinfektion bei unterschiedlicher Anzahl transferierter Zellen. Zellverdünnungen von $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^2$ CD8 T-Zellen von OT-I Thy1.1 iCD28ko Tieren wurden in Empfängertiere injiziert und die Tiere mit geringer Dosis Lm-OVA infiziert. 7 Tage nach Infektion wurden die Tiere analysiert und transferierte und endogene, antigenspezifische (H-2K^b/SIINFEKL⁺) Zellen in der Milz nachgewiesen (A). Weitere Tiere wurden nach einem Monat erneut mit hoher Dosis infiziert und nach 5 Tagen in gleicher Weise analysiert (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 3 Mäusen pro Zellverdünnung..... 67
- Abbildung 17: Versuchsaufbau Transferexperiment zur Analyse der Primärantwort 69

Abbildung 18: CD28 Expressionsprofil endogener antigenspezifischer und transferierter CD8 T-Zellen. Milzzellen wurden am Tag 7 der Primärinfektion mit anti Thy1.1, anti CD8, anti CD28 und Streptameren® gefärbt. Die Dot Plots oben zeigen die Zellen einer Empfängermaus, welche mit Tamoxifen (TM) behandelt wurde, die unteren zeigen die Zellen einer kontrollbehandelten Maus (Öl). Vom Live Gate im FSC/SSC Dot Plot wurde zunächst auf die CD8 positiven Zellen gated und diese nach Thy1.1 positiven, transferierten und endogenen Zellen aufgetrennt. Innerhalb der endogenen Zellen wurde auf die antigenspezifischen H-2K^b/SIINFEKL positiven Zellen gated. Das CD28 Expressionsprofil endogener antigenspezifischer Zellen (schwarz) wurde mit dem der transferierten Zellen (blau) verglichen. . 69

Abbildung 19: Expansion und Effektorfunktion transferierter CD8 T-Zellen am Höhepunkt der Primärinfektion nach CD28 Deletion oder Kontrollbehandlung sowie Expansion der endogenen antigenspezifischen Zellen. An Tag 7 nach der Primärinfektion wurden die Milzen der Empfängertiere analysiert und transferierte Zellen sowie antigenspezifische, H-2k^b/SIINFEKL positive, Thy1.1 negative Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen (A), sowie in absoluter Zellzahl (B) mit FACS Färbungen nachgewiesen. Milzzellen wurden für 5 h in Anwesenheit des Antigens SIINFEKL restimuliert und die Degranulation (C) sowie die IFN- γ Produktion (D) der transferierten Zellen durch FACS Färbung analysiert. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte von 3-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. In A und B werden gepoolte Daten aus 2 Experimenten gezeigt. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 71

Abbildung 20: Phänotypisierung und Analyse der T-bet Expression transferierter Zellen am Tag 7 der Primärantwort. Aktivierte Zellen werden nach Expression der Oberflächenmoleküle CD127 und KLRG-1 in SLEC, DPEC, EEC und MPEC eingeteilt. Beispiele eines Dot Plots TM behandelte und Öl behandelte transferierte Zellen nach Oberflächenfärbung werden gezeigt (A). B stellt die Zusammensetzung des Phänotyps transferierter Zellen nach CD28 Deletion (TM) bzw. Kontrollbehandlung (Öl) dar, weiterhin wurde der MFI der T-bet

Expression in transferierten Zellen durch intrazelluläre FACS Färbung ermittelt (C). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 5 Mäusen.

Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 72

Abbildung 21: Versuchsaufbau Transferexperiment zur Analyse der Sekundärantwort 74

Abbildung 22: Expansion und Effektorfunktion transferierter CD8 T-Zellen am Höhepunkt der Sekundärinfektion nach CD28 Deletion oder Kontrollbehandlung (Öl) entweder vor der Primärantwort (TM vor 1°) oder der Sekundärantwort (TM vor 2°), sowie Expansion der endogenen, antigenspezifischen Zellen. Am Tag 5 nach der Sekundärinfektion wurden die Milzen der Empfängertiere analysiert und transferierte Zellen sowie antigenspezifische, H-2k^b/SIINFEKL+, Thy1.1- Zellen innerhalb der CD8 T-Zellen (A), sowie in absoluter Zellzahl (B) mit FACS Färbungen nachgewiesen. Milzzellen wurden für 5 h in Anwesenheit des Antigens SIINFEKL restimuliert und die Degranulation (C) sowie die IFN- γ Produktion (D) der transferierten Zellen durch FACS Färbung analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 3-5 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. In A und B werden gepoolte Daten aus 2 Experimenten gezeigt. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 76

Abbildung 23: Phänotypisierung und Analyse der T-bet Expression transferierter Zellen am Tag 5 der Sekundärantwort. Transferierte Zellen, welche entweder vor der Primärinfektion (TM vor 1°) oder vor der Sekundärinfektion (TM vor 2°) mit Tamoxifen zur CD28 Deletion behandelt wurden bzw. Kontrollzellen (Öl), wurden aufgrund der CD127 und KLRG-1 Expression in Effektor- und Gedächtnisvorläufersubtypen eingeteilt und der Phänotyp der transferierten Zellen am Tag 5 der Sekundärantwort bestimmt (A). Weiterhin wurde der MFI der T-bet Expression in transferierten Zellen durch intrazelluläre FACS Färbung ermittelt (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 5 Mäusen. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 76

- Abbildung 24: Versuchsaufbau zur Beobachtung und Analyse von Gedächtniszellen 77
- Abbildung 25: Expansion und Effektorfunktion von Gedächtniszellen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Primärinfektion. Milzzellen Listerien infizierter Mäuse, welche an Tag 6 bis 10 der Primärantwort mit Tamoxifen behandelt wurden, um CD28 in transferierten Zellen zu deletieren, wurden auf den Anteil transferierter Thy1.1 positiver Zellen innerhalb der CD8 Zellen und die Anzahl transferierter Thy1.1 positiver Zellen pro Milz analysiert (A), sowohl 19 und 90 Tage nach Primär-, als auch 5 Tage nach Sekundärinfektion. Weiterhin wurden zu den drei Analysezeitpunkten (Tag 19, B, Tag 90 C und Tag 5 nach boost, D) Milzzellen *in vitro* mit Antigen SIINFEKL für 5 h stimuliert und auf Degranulation (links) und IFN- γ Produktion (rechts) untersucht. Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4 Mäusen, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied..... 78
- Abbildung 26: Phänotypisierung transferierter Gedächtniszellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Primärinfektion. Transferierte Zellen nach CD28 Deletion (TM) bzw. Kontrollbehandlung (ÖI) an Tag 6 bis 10 der Primärinfektion wurden aufgrund der CD127 und KLRG-1 Expression in Effektor- und Gedächtnisvorläufersubtypen eingeteilt und der Phänotyp der transferierten Zellen an Tag 19 und Tag 90 nach der Primärantwort sowie Tag 5 nach der Sekundärantwort bestimmt (A). Weiterhin wurde der MFI der T-bet Expression in transferierten Zellen an den verschiedenen Analysezeitpunkten durch intrazelluläre FACS Färbung ermittelt (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte von 4 Mäusen. Ungepaarter t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,01$, ns: kein signifikanter Unterschied. 79
- Abbildung 27: Analysestrategie der Effektorfunktionen *in vitro* restimulierter, antigenspezifischer CD8 T-Zellen. Nach vierstündiger Inkubation in Anwesenheit von SIINFEKL (Reihe 3 und 6) wurden T-Zellen auf Anwesenheit des SIINFEKL-spezifischen T-Zell- Rezeptors und IFN- γ Produktion bzw. CD107a Exposition getestet. Zur Kontrolle dienten Zellen, welche das gleiche Stimulationsprozedere in Abwesenheit von

Antigen durchliefen (Reihe 2 und 5). Zur Vergleichbarkeit der Frequenz antigenspezifischer Zellen vor der Restimulation sind die Ergebnisse der direkten ex vivo Färbung (Reihe 1 und 4) gezeigt. Reihe 1-3 zeigt Zellen, von denen CD28 durch Tamoxifengabe deletiert wurde (TM), Reihe 4-6 CD28 suffiziente Kontrollzellen (Öl). 84

Abkürzungsverzeichnis

4-1BB	tumor necrosis factor receptor superfamily member 9
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod (activation induced cell death)
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
B6	C57BL/6J, wildtypische Maus
Bcl-6	B-Zelllymphom 6 Protein
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
Blimp-1	PRDM-1, PR-Domäne Zinkfingerprotein 1
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Balanced Salt Solution
BV-421	Brilliant Violet 421
Cbl-b	E3 Protein-Ubiquitin Proteinligase
CCR7	Chemokin Rezeptor Typ 7
CD	Cluster of Differentiation
CD127	Interleukin-7 Rezeptor
CD62L	L-Selectin
CIM	C-Protein induzierte Myositis
Cre	causes recombination-Protein
cSMAC	Central supramolecular activation cluster
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CX3CR1	CX3C Chemokin Rezeptor, Fraktalkin Rezeptor
CXCR3	Chemokinrezeptor 3
CXCR4	Chemokinzezeptor 4
Cy5	Cyanin 5

Cy7	Cyanin 7
DAG	Diacylglycerin
DPEC	Double positive effector cells, Doppelpositive Effektorzellen
EEC	Early effector cells, frühe Effektorzellen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
flox	Flankiert von loxP
Foxp3	Forkhead box P3
FSC	Forward scatter
Grb-2	Growth factor receptor-bound protein 2
HSV	Herpes simplex Virus
ICAM1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
iCD28ko	Induzierte Cd28 knockout Linie
IFN- γ	Interferon γ
IFN- γ R	Interferon γ Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin-10
IL-2	Interleukin-2
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KLRG-1	Killer-cell-Lectin-like Rezeptor G1
LAT	Linker for Activation of T cells
LBPA	lysobisphosphatidic acid
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LCMV	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
<i>Lm-OVA</i>	Ovalbumin produzierende <i>Listeria</i>

	<i>monocytogenes</i>
loxP	locus of X-over P1
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MHV-68	Murines Gammaherpesvirus 68
mLN, LN	Mesenteriallymphknoten
MPEC	Memory precursor effector cells, Gedächtnisvorläufer-Effektorzellen
MPV	Murines Papillomavirus
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
ns	Nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
Ox40	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4 (TNFRSF4)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PE	Phycoerythrin
PercP	Peridinin-Chlorophyll-protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
pSMAC	Peripheral supramolecular activation cluster
rpm	Rounds per minute
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B (Superantigen)

SLAM	Signaling lymphocyte activation molecule
SLEC	Short lived effector cells, kurzlebige Effektorzellen
SLP76	SRC homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa
SP	Milz
SSC	Side scatter
T-bet	T-box Transkriptionsfaktor TBX21
TGF- β	Transforming growth factor β
T _H 1	T-Helfer-1 Zelle
T _H 17	T-Helfer-17 Zelle
T _H 2	T-Helfer-2 Zelle
Thy1.1	Thymocyte differentiation antigen 1.1
TM	Tamoxifen
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell Rezeptor
VSV	Vesicular stomatitis virus
VV	Vaccinia Virus
Zap70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

Literaturverzeichnis

- Alarcon, B., D. Mestre and N. Martinez-Martin (2011). "The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering?" Immunology **133**(4): 420-425.
- Arens, R., A. Loewendorf, A. Redeker, S. Siervo, L. Boon, P. Klenerman, C. A. Benedict and S. P. Schoenberger (2011). "Differential B7-CD28 costimulatory requirements for stable and inflationary mouse cytomegalovirus-specific memory CD8 T cell populations." J. Immunol. **186**(7): 3874-3881.
- Badovinac, V. P., J. S. Haring and J. T. Harty (2007). "Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection." Immunity **26**(6): 827-841.
- Bertram, E. M., P. Lau and T. H. Watts (2002). "Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection." J Immunol **168**(8): 3777-3785.
- Beyersdorf, N., X. Ding, G. Blank, K. M. Dennehy, T. Kerkau and T. Hunig (2008). "Protection from graft-versus-host disease with a novel B7 binding site-specific mouse anti-mouse CD28 monoclonal antibody." Blood **112**(10): 4328-4336.
- Beyranvand Nejad, E., T. C. van der Sluis, S. van Duikeren, H. Yagita, G. M. Janssen, P. A. van Veelen, C. J. Melief, S. H. van der Burg and R. Arens (2016). "Tumor Eradication by Cisplatin Is Sustained by CD80/86-Mediated Costimulation of CD8+ T Cells." Cancer Res **76**(20): 6017-6029.
- Blattman, J. N., R. Antia, D. J. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman and R. Ahmed (2002). "Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells." J Exp Med **195**(5): 657-664.
- Boomer, J. S. and J. M. Green (2010). "An enigmatic tail of CD28 signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(8): a002436.
- Borowski, A. B., A. C. Boesteanu, Y. M. Mueller, C. Carafides, D. J. Topham, J. D. Altman, S. R. Jennings and P. D. Katsikis (2007). "Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation." J. Immunol. **179**(10): 6494-6503.
- Chang, J. T., V. R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A. M. Intlekofer, A. Banerjee, S. A. Longworth, K. E. Vinup, P. Mrass, J. Oliaro, N. Killeen, J. S. Orange, S. M. Russell, W. Weninger and S. L. Reiner (2007). "Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses." Science **315**(5819): 1687-1691.
- Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S3-23.

- Collins, A. V., D. W. Brodie, R. J. Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, D. I. Stuart, P. A. van der Merwe and S. J. Davis (2002). "The interaction properties of costimulatory molecules revisited." Immunity **17**(2): 201-210.
- Croft, M., L. M. Bradley and S. L. Swain (1994). "Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells." J Immunol **152**(6): 2675-2685.
- Cui, W., Y. Liu, J. S. Weinstein, J. Craft and S. M. Kaech (2011). "An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells." Immunity **35**(5): 792-805.
- Danilova, N. (2012). "The evolution of adaptive immunity." Adv Exp Med Biol **738**: 218-235.
- Das, R., R. Verma, M. Sznol, C. S. Boddupalli, S. N. Gettinger, H. Kluger, M. Callahan, J. D. Wolchok, R. Halaban, M. V. Dhodapkar and K. M. Dhodapkar (2015). "Combination therapy with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 leads to distinct immunologic changes in vivo." J Immunol **194**(3): 950-959.
- Dennehy, K. M., F. Elias, S. Y. Na, K. D. Fischer, T. Hunig and F. Luhder (2007). "Mitogenic CD28 signals require the exchange factor Vav1 to enhance TCR signaling at the SLP-76-Vav-Itk signalosome." J Immunol **178**(3): 1363-1371.
- Dennehy, K. M., F. Elias, G. Zeder-Lutz, X. Ding, D. Altschuh, F. Luhder and T. Hunig (2006). "Cutting edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses." J Immunol **176**(10): 5725-5729.
- Dustin, M. L., A. K. Chakraborty and A. S. Shaw (2010). "Understanding the structure and function of the immunological synapse." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(10): a002311.
- Eberlein, J., B. Davenport, T. Nguyen, F. Victorino, K. Haist, K. Jhun, A. Karimpour-Fard, L. Hunter, R. Kedl, E. T. Clambey and D. Homann (2016). "Aging promotes acquisition of naive-like CD8+ memory T cell traits and enhanced functionalities." J Clin Invest **126**(10): 3942-3960.
- Eberlein, J., B. Davenport, T. T. Nguyen, F. Victorino, T. Sparwasser and D. Homann (2012). "Multiple layers of CD80/86-dependent costimulatory activity regulate primary, memory, and secondary lymphocytic choriomeningitis virus-specific T cell immunity." J Virol **86**(4): 1955-1970.
- Escors, D., C. Bricogne, F. Arce, G. Kochan and K. Karwacz (2011). "On the Mechanism of T cell receptor down-modulation and its physiological significance." J Biosci Med **1**(1).
- Evans, E. J., R. M. Esnouf, R. Manso-Sancho, R. J. Gilbert, J. R. James, C. Yu, J. A. Fennelly, C. Vowles, T. Hanke, B. Walse, T. Hunig, P. Sorensen, D. I. Stuart and S. J. Davis (2005). "Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex." Nat Immunol **6**(3): 271-279.

- Flynn, K. and A. Mullbacher (1996). "Memory alloreactive cytotoxic T cells do not require costimulation for activation *in vitro*." Immunol Cell Biol **74**(5): 413-420.
- Fukuda, M. (1991). "Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking." J Biol Chem **266**(32): 21327-21330.
- Fuse, S., J. J. Obar, S. Bellfy, E. K. Leung, W. Zhang and E. J. Usherwood (2006). "CD80 and CD86 control antiviral CD8+ T-cell function and immune surveillance of murine gammaherpesvirus 68." J Virol **80**(18): 9159-9170.
- Fuse, S., W. Zhang and E. J. Usherwood (2008). "Control of memory CD8+ T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response." J Immunol **180**(2): 1148-1157.
- Galluzzi, L., L. Senovilla, L. Zitvogel and G. Kroemer (2012). "The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs." Nat Rev Drug Discov **11**(3): 215-233.
- Gerritsen, B. and A. Pandit (2016). "The memory of a killer T cell: models of CD8(+) T cell differentiation." Immunol Cell Biol **94**(3): 236-241.
- Gmunder, H. and W. Lesslauer (1984). "A 45-kDa human T-cell membrane glycoprotein functions in the regulation of cell proliferative responses." Eur J Biochem **142**(1): 153-160.
- Gogishvili, T., F. Luhder, S. Goebbels, S. Beer-Hammer, K. Pfeffer and T. Hunig (2013). "Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion." European Journal of Immunology **43**(1): 188-193.
- Gogishvili, T., F. Luhder, F. Kirstein, N. E. Nieuwenhuizen, S. Goebbels, S. Beer-Hammer, K. Pfeffer, S. Reuter, C. Taube, F. Brombacher and T. Hunig (2012). "Interruption of CD28-mediated costimulation during allergen challenge protects mice from allergic airway disease." J Allergy Clin Immunol **130**(6): 1394-1403 e1394.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-227.
- Grujic, M., C. Bartholdy, M. Remy, D. D. Pinschewer, J. P. Christensen and A. R. Thomsen (2010). "The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8+ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus." J Immunol **185**(3): 1730-1743.
- Halstead, M. E. and D. T. Bernhardt (2002). "Common infections in the young athlete." Pediatr Ann **31**(1): 42-48.
- Hasegawa, H., K. Kawahata, F. Mizoguchi, N. Okiyama, N. Miyasaka and H. Kohsaka (2017). "Direct suppression of autoaggressive CD8+ T cells with CD80/86 blockade in CD8+ T cell-mediated polymyositis models of mice." Clin Exp Rheumatol.

- Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin and S. M. Kaech (2007). "Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor." Immunity **27**(2): 281-295.
- Joshi, N. S., W. Cui, C. X. Dominguez, J. H. Chen, T. W. Hand and S. M. Kaech (2011). "Increased numbers of preexisting memory CD8 T cells and decreased T-bet expression can restrain terminal differentiation of secondary effector and memory CD8 T cells." J Immunol **187**(8): 4068-4076.
- Kaech, S. M. and W. Cui (2012). "Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation." Nat Rev Immunol **12**(11): 749-761.
- Kaech, S. M., S. Hemby, E. Kersh and R. Ahmed (2002). "Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation." Cell **111**(6): 837-851.
- Kamphorst, A. O., A. Wieland, T. Nasti, S. Yang, R. Zhang, D. L. Barber, B. T. Konieczny, C. Z. Daugherty, L. Koenig, K. Yu, G. L. Sica, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, B. R. Blazar, L. A. Turka, T. K. Owonikoko, R. N. Pillai, S. S. Ramalingam, K. Araki and R. Ahmed (2017). "Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent." Science **355**(6332): 1423-1427.
- Kim, S. K., K. S. Schluns and L. Lefrancois (1999). "Induction and visualization of mucosal memory CD8 T cells following systemic virus infection." J Immunol **163**(8): 4125-4132.
- Kimzey, S. L., P. Liu and J. M. Green (2004). "Requirement for CD28 in the effector phase of allergic airway inflammation." J Immunol **173**(1): 632-640.
- Krummel, M. F., T. J. Sullivan and J. P. Allison (1996). "Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo." Int Immunol **8**(4): 519-523.
- Kundig, T. M., A. Shahinian, K. Kawai, H. W. Mittrucker, E. Sebzda, M. F. Bachmann, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1996). "Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells." Immunity **5**(1): 41-52.
- Kursar, M., K. Bonhagen, J. Fensterle, A. Kohler, R. Hurwitz, T. Kamradt, S. H. Kaufmann and H. W. Mittrucker (2002). "Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses." J Exp Med **196**(12): 1585-1592.
- Kursar, M., A. Kohler, S. H. Kaufmann and H. W. Mittrucker (2004). "Depletion of CD4+ T cells during immunization with nonviable *Listeria monocytogenes* causes enhanced CD8+ T cell-mediated protection against listeriosis." J Immunol **172**(5): 3167-3172.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2002). "Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response." Nat Rev Immunol **2**(12): 982-987.
- Lauritsen, J. P., M. D. Christensen, J. Dietrich, J. Kastrup, N. Odum and C. Geisler (1998). "Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR." J Immunol **161**(1): 260-267.

- Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet and P. Cossart (2001). "A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier." Science **292**(5522): 1722-1725.
- Levin, S. E., C. Zhang, T. A. Kadlecsek, K. M. Shokat and A. Weiss (2008). "Inhibition of ZAP-70 kinase activity via an analog-sensitive allele blocks T cell receptor and CD28 superagonist signaling." J Biol Chem **283**(22): 15419-15430.
- Lezzi, G., K. Karjalainen and A. Lanzavecchia (1998). "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells." Immunity **8**(1): 89-95.
- London, C. A., M. P. Lodge and A. K. Abbas (2000). "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." J Immunol **164**(1): 265-272.
- Luhder, F., Y. Huang, K. M. Dennehy, C. Guntermann, I. Muller, E. Winkler, T. Kerkau, S. Ikemizu, S. J. Davis, T. Hanke and T. Hunig (2003). "Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists." J Exp Med **197**(8): 955-966.
- Lumsden, J. M., J. M. Roberts, N. L. Harris, R. J. Peach and F. Ronchese (2000). "Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection." J Immunol **164**(1): 79-85.
- Martin, M. D. and V. P. Badovinac (2016). "Sifting through CD8+ T Cell Memory." Immunity **45**(6): 1184-1186.
- McAdam, A. J., E. A. Farkash, B. E. Gewurz and A. H. Sharpe (2000). "B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte generation in the host response to vesicular stomatitis virus." J Virol **74**(1): 203-208.
- Mittrucker, H. W., M. Kursar, A. Kohler, R. Hurwitz and S. H. Kaufmann (2001). "Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*." J Immunol **167**(10): 5620-5627.
- Ndejemi, M. P., J. R. Teijaro, D. S. Patke, A. W. Bingaman, M. R. Chandok, A. Azimzadeh, S. G. Nadler and D. L. Farber (2006). "Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway." J Immunol **177**(11): 7698-7706.
- Ndlovu, H., M. Darby, M. Froelich, W. Horsnell, F. Luhder, T. Hunig and F. Brombacher (2014). "Inducible deletion of CD28 prior to secondary *nippostrongylus brasiliensis* infection impairs worm expulsion and recall of protective memory CD4(+) T cell responses." PLoS Pathog **10**(2): e1003906.
- Obar, J. J., E. R. Jellison, B. S. Sheridan, D. A. Blair, Q. M. Pham, J. M. Zickovich and L. Lefrancois (2011). "Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation." J Immunol **187**(10): 4967-4978.
- Padrid, P. A., M. Mathur, X. Li, K. Herrmann, Y. Qin, A. Cattamanchi, J. Weinstock, D. Elliott, A. I. Sperling and J. A. Bluestone (1998). "CTLA4Ig inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness by regulating the development of

Th1/Th2 subsets in a murine model of asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **18**(4): 453-462.

Perrin, P. J., C. H. June, J. H. Maldonado, R. B. Ratts and M. K. Racke (1999). "Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **163**(3): 1704-1710.

Plumlee, C. R., B. S. Sheridan, B. B. Cicek and L. Lefrancois (2013). "Environmental cues dictate the fate of individual CD8+ T cells responding to infection." Immunity **39**(2): 347-356.

Pope, C., S. K. Kim, A. Marzo, D. Masopust, K. Williams, J. Jiang, H. Shen and L. Lefrancois (2001). "Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **166**(5): 3402-3409.

Reinert, R. B., J. Kantz, A. A. Misfeldt, G. Poffenberger, M. Gannon, M. Brissova and A. C. Powers (2012). "Tamoxifen-Induced Cre-loxP Recombination Is Prolonged in Pancreatic Islets of Adult Mice." PLoS One **7**(3): e33529.

Romer, P. S., S. Berr, E. Avota, S. Y. Na, M. Battaglia, I. ten Berge, H. Einsele and T. Hunig (2011). "Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412." Blood **118**(26): 6772-6782.

Ruitenbergh, J. J., S. A. Ghanekar, D. G. Brockstedt and H. T. Maecker (2007). "Simultaneous detection of murine antigen-specific intracellular cytokines and CD107a/CD107b by flow cytometry." Protocol Exchange.

Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.

Sanchez-Ruiz, M., L. Wilden, W. Muller, W. Stenzel, A. Brunn, H. Miletic, D. Schluter and M. Deckert (2008). "Molecular mimicry between neurons and an intracerebral pathogen induces a CD8 T cell-mediated autoimmune disease." J Immunol **180**(12): 8421-8433.

Sarkar, S., V. Kalia, W. N. Haining, B. T. Konieczny, S. Subramaniam and R. Ahmed (2008). "Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates." J Exp Med **205**(3): 625-640.

Seibler, J., B. Zevnik, B. Kuter-Luks, S. Andreas, H. Kern, T. Hennek, A. Rode, C. Heimann, N. Faust, G. Kauselmann, M. Schoor, R. Jaenisch, K. Rajewsky, R. Kuhn and F. Schwenk (2003). "Rapid generation of inducible mouse mutants." Nucleic Acids Res **31**(4): e12.

Seo, S. K., H. Y. Jeong, S. G. Park, S. W. Lee, I. W. Choi, L. Chen and I. Choi (2008). "Blockade of endogenous B7-H1 suppresses antibacterial protection after primary *Listeria monocytogenes* infection." Immunology **123**(1): 90-99.

- Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson and T. W. Mak (1993). "Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice." Science **261**(5121): 609-612.
- Suresh, M., J. K. Whitmire, L. E. Harrington, C. P. Larsen, T. C. Pearson, J. D. Altman and R. Ahmed (2001). "Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory." J Immunol **167**(10): 5565-5573.
- Tacke, M., G. Hanke, T. Hanke and T. Hunig (1997). "CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28." Eur J Immunol **27**(1): 239-247.
- van der Heide, V. and D. Homann (2016). "CD28 days later: Resurrecting costimulation for CD8(+) memory T cells." Eur J Immunol **46**(7): 1587-1591.
- Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." Science **273**(5271): 104-106.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." Nat Immunol **12**(6): 492-499.
- Williams, M. A. and M. J. Bevan (2007). "Effector and memory CTL differentiation." Annu Rev Immunol **25**: 171-192.
- Yu, X. Z., M. H. Albert, P. J. Martin and C. Anasetti (2004). "CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens." J Clin Invest **113**(11): 1624-1630.
- Yuzefpolskiy, Y., F. M. Baumann, V. Kalia and S. Sarkar (2015). "Early CD8 T-cell memory precursors and terminal effectors exhibit equipotent in vivo degranulation." Cell Mol Immunol **12**(4): 400-408.
- Zhang, M., S. Byrne, N. Liu, Y. Wang, A. Oxenius and P. G. Ashton-Rickardt (2007). "Differential survival of cytotoxic T cells and memory cell precursors." J Immunol **178**(6): 3483-3491.
- Zhong, Z. A., W. Sun, H. Chen, H. Zhang, Y. A. Lay, N. E. Lane and W. Yao (2015). "Optimizing tamoxifen-inducible Cre/loxp system to reduce tamoxifen effect on bone turnover in long bones of young mice." Bone **81**: 614-619.
- Zhu, Y., S. Yao and L. Chen (2011). "Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model." Immunity **34**(4): 466-478.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Monika Fröhlich

09/2003 – 08/2009: Studium der Biologie an der Universität Würzburg

1994 - 2003: Riemenschneider Gymnasium Würzburg mit Abschluss Abitur

Publikationen:

Fröhlich M, Gogishvili T, Langenhorst D, Lühder F, Hünig T. **Interrupting CD28 costimulation before antigen rechallenge affects CD8(+) T-cell expansion and effector functions during secondary response in mice.** Eur J Immunol. 2016 Jul;46(7):1644-55

Nlovu H, Darby M, Froelich M, Horsnell W, Lühder F, Hünig, T, Brombacher F. 2014. **Inducible deletion of CD28 prior to secondary nippostrongylus brasiliensis infection impairs worm expulsion and recall of protective memory CD4⁺ T cell responses.** PLoS Pathog. 6:10 (2)

Hunig T, Lühder F, Elflein K, Gogishvili T, Frohlich M, Guler R, Cutler A, Brombacher F. 2010. **CD28 and IL-4: two heavyweights controlling the balance between immunity and inflammation.** Med Microbiol. Immunol. 199: 239-246

Somberg, M., Zhao, X., Frohlich, M., Evander, M., Schwartz, S. 2008. **Polypyrimidine Tract Binding Protein Induces Human Papillomavirus Type 16 Late Gene Expression by Interfering with Splicing Inhibitory Elements at the Major Late 5' Splice Site, SD3632;** J. Virol. 82: 3665-3678

Auszeichnungen:

Preis über 100 € für das Poster „CD28 is required for secondary CD8 T-cell responses“ auf dem 40. Jährlichen Treffen der deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Leipzig, 22.-25.09.2010

Mitgliedschaften:

Seit 01.09.2009: Mitglied des internationalen Graduiertenkollegs IRTG 1522 „HIV/AIDS and associated infectious diseases in Southern Africa

Seit 01.09.2009: Mitglied der Graduiertenschule (GSLs). Im Rahmen dessen Teilnahme am „Female Mentoring Program“ von Juli 2010 bis Juli 2011

Seit 04.10.2010: Mitglied der deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI)

Kongresse und Symposia

2010 Second International Meeting of the IRTG 1522

Vortrag: "The role of CD28 in response to pathogens – the German side: Listeriosis

13.-16. Mai, Kloster Banz, Bad Staffelstein, Deutschland

40. Annual Meeting of the German Society for Immunology

Poster: „CD28 is required for secondary immune responses”

22.-25. Sept., Leipzig, Deutschland

5. Internationales GSLS Symposium „Chiasma, on the Crossroads of Research”,

Poster: „CD28 is required for secondary immune responses “

13.-14. Okt., Würzburg, Deutschland

2011 Third International Meeting of the IRTG 1522

Vortrag: "CD28 is required for secondary CD8 T-cell responses”

22.-26. Feb., Stellenbosch, Südafrika

6. Annual GK-Network Meeting der Universitäten Würzburg, Erlangen, Tübingen

Gastvortrag: "CD28 is important for memory CD8 T-cell responses”

06.-08. Juni, Neresheim, Deutschland

16. International Summer School in Immunology

Poster: "CD28 is required for secondary CD8 T-cell responses”

03.-11. Sept., Hvar, Kroatien

6. Internationales GSLS Symposium „BioBang”,

19.-20. Okt., Würzburg, Deutschland

2012 Fourth International Meeting of the IRTG 1522 "HIV and associated diseases”

Vortrag: "CD28 is required for secondary CD8 T-cell responses”

19.-20. Jan., Würzburg, Deutschland

IRTG 1522: Symposium to apply for extension of the IRTG 1522

Poster: "CD28 costimulation is required for type 1 and type 2 memory immune responses”

24.-26. Juni, Würzburg, Germany

7. Internationales GSLS Symposium „EPOS”,

16.-17. Okt., Würzburg, Deutschland