

Aus dem Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
Kommissarischer Ärztlicher Direktor: Professor. Dr. A. Melms

Die Rolle neuer Kostimulationsmoleküle der
B7-Familie in der Immunantwort

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sabine Wintterle
aus Stuttgart

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Melms

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Röcken

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
2. Ergebnisse	6
2.1 Originalpublikation „Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis”	6
2.2 Expression und funktionelle Rolle von B7-H3 im Muskel.....	13
3. Zusammenfassung	19
3.1 Expression und Relevanz von B7-H1 in humanen Gliomen	19
3.2 Expression und Relevanz von B7-H3 im humanen Muskel: Implikation für muskuläre Immunantworten	22
4. Abkürzungsverzeichnis	23
5. Literaturverzeichnis	24
6. Danksagung	27
7. Lebenslauf	29

1. Einleitung

Auf dem Gebiet der Immunologie hat es in den letzten Jahrzehnten einen enormen Wissenszuwachs gegeben. Dank der Neucharakterisierung molekularer und zellulärer Komponenten, der Möglichkeit der Gentechnologie und der weitergehenden Entwicklung technischer Geräte und Testsysteme verstehen wir heute die grundlegenden Mechanismen, die unserem Immunsystem zur Verfügung stehen. Viele Details und Möglichkeiten der Interaktion und Kommunikation sind aber nach wie vor unbekannt. Das Ziel ist also ein besseres Verständnis immunologischer Kernmechanismen, auch für die Möglichkeit der Entwicklung spezifischer Therapeutika.

Die vorliegende Arbeit widmet sich einem Teilbereich der Immunologie, der T-Zell Aktivierung. Dem aktuellen Verständnis liegt die so genannte Zwei-Signal-Theorie zugrunde. Sie besagt, dass eine T-Zelle neben der Erkennung ihres spezifischen Antigens über 'T-Zellrezeptor – MHC¹-Molekül – Interaktion' (Signal 1) noch ein weiteres Signal (Signal 2) benötigt, um eine effektive Aktivierung auslösen zu können. Dieses Signal wird als Kostimulation bezeichnet, das sowohl verstärkend als auch hemmend sein kann [1]. Die ersten und am besten untersuchten Moleküle sind CD80 und CD86, auch bekannt als B7.1 und B7.2 der B7-Familie von Kostimulationsmolekülen. Diese Liganden interagieren mit CD28 sowie CTLA-4² auf T-Zellen und bestimmen maßgeblich Quantität und Qualität primärer und sekundärer Immunantworten. In den letzten Jahren wurden neue Mitglieder identifiziert und charakterisiert. Zu diesen gehören die B7-Homologe 1 und 3, B7-H1³ und B7-H3⁴, deren pathophysiologische Relevanz in dieser Arbeit näher charakterisiert werden sollte.

Einen guten Überblick über die aktuelle Datenlage bezüglich Kostimulationsmolekülen bietet der Review-Artikel 'The B7 family revisited' [2].

¹ Major Histocompatibility Complex

² Cytotoxic T-Lymphocyte associated Antigen - 4

³ B 7 Homologue 1

⁴ B 7 Homologue 3

B7-H1

Das B7-Homolog 1 (B7-H1), auch PD-L1⁵ genannt, wird sowohl im lymphatischen Gewebe als auch in nicht-lymphatischen Geweben wie z.B. Herz, Lunge, Pankreas, Plazenta, Muskel und verschiedenen Tumoren vorgefunden [3][5]. Dies steht im Gegensatz zu CD80 und CD86, die ausschließlich im lymphatischen Gewebe vorkommen. Ein bekannter Rezeptor von B7-H1 ist PD-1⁶, der überwiegend inhibitorische Signale für die T-Zelle leitet [4][5]. Neben PD-1 existiert vermutlich noch ein zweiter B7-H1-Rezeptor, der derzeit aber noch unbekannt ist. Frühe Untersuchungen zur Rolle von B7-H1 beschrieben vor allem positiv stimulierende Wirkungen wie Induktion von T-Zell Proliferation, IL⁷-10- und IFN⁸- γ -Sekretion [3]. In letzter Zeit überwiegen jedoch Berichte über hemmende Wirkungen wie Rückgang von Zytokinsekretion und Zellzyklus-Arrest [4][6].

Studien, die die Rolle von B7-H1 vor allem auf soliden Tumoren im Mausmodell untersucht haben, konnten zeigen, dass Tumore, die B7-H1 auf ihrer Zelloberfläche haben, gesteigertes Wachstum zeigen und eine erhöhte Rate an Apoptose bei spezifischen, gegen den Tumor gerichteten T-Zellen (vor allem CD8+ T-Zellen) aufweisen [7][8][9]. In Mäusen, denen der Rezeptor PD-1 gänzlich fehlt, ist das Wachstum von B7-H1 tragenden Tumoren gebremst und kann teilweise total unterbunden werden [7]. Diese Ergebnisse suggerieren, dass der B7-H1 – PD-1 – Signalweg eine mögliche Immuntherapiestrategie darstellen könnte.

Das Ziel der experimentellen Arbeit war die Charakterisierung der Rolle von B7-H1 in humanen Glioblastomen. Diese Tumoren sind beispielhaft in ihrer Fähigkeit eine effektive Immunantwort zu unterbinden. Verschiedene immunevasive Strategien wurden hierfür in den letzten Jahren charakterisiert, zu denen insbesondere Tumor-derivierte Faktoren, zellgebundene oder lösliche gehören [10][11].

⁵ Programmed Death – Ligand 1

⁶ Programmed Death 1

⁷ Interleukin

⁸ Interferon

B7-H3

Das B7-Homolog 3 (B7-H3), auch B7RP-2⁹ genannt, kommt in zwei unterschiedlichen 'Splice-Varianten' vor, 4Ig¹⁰-B7-H3 und 2Ig-B7-H3, deren genaue Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist [14][15]. Der Rezeptor für B7-H3 ist bislang nicht identifiziert, unterscheidet sich von CD28, CTLA-4, ICOS¹¹ und PD-1 und kommt auf der Zelloberfläche von aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen vor, nicht aber auf ruhenden T-Zellen [12]. B7-H3 ist wie B7-H1 breit im lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe exprimiert [12][13]. In der aktuellen Studienlage zur funktionellen Bedeutung von B7-H3 gibt es sowohl Berichte über stimulierende Effekte wie vermehrte T-Zell Proliferation, gesteigerte IFN- γ -Sekretion, stärkere lytische Aktivität von CD8+ T-Zellen und Abnahme von Tumormasse [12][16][17], als auch hemmende Effekte [18][19]. B7-H3 knock-out Mäuse suggerieren, dass B7-H3 inhibitorisch auf die T-Zell Aktivierung unter TH1-Bedingungen (entzündliches Milieu mit Überwiegen an IL-2 und IFN- γ) wirkt [19]. Aktuell geht man eher davon aus, dass B7-H3 ein schwächerer Signalgeber ist als andere Mitglieder der B7-Familie wie CD80 oder B7-H1 und dass es mit diesen auch sich überschneidende Funktionsbereiche geben könnte. Möglich ist auch die Existenz von mehreren Rezeptoren für B7-H3, die die Diversität der Befunde erklären könnte.

Die Muskulatur ist ein interessantes immunologisches System, in dem sich sowohl autoimmune Erkrankungen, z.B. Polymyositis, als auch infektiöse Erkrankungen abspielen. Weiterhin spielt sie auch eine große Rolle bei der Gentherapie von z.B. hereditären Muskelerkrankungen wie der Muskeldystrophie Duchenne [21][22][23]. Physiologisch kommen dort keine MHC-Moleküle vor. Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. entzündlichem Milieu in Gegenwart von IFN- γ und TNF¹²- α werden MHC Klasse I, auf niedrigerem Niveau auch MHC Klasse II Moleküle auf der Oberfläche von Muskelzellen exprimiert, sodass theoretisch eine Grundvoraussetzung zur Antigenpräsentation gegeben ist [20].

⁹ B 7 Related Protein - 2

¹⁰ Immunoglobulin

¹¹ Inducible COStimulator

¹² Tumor Necrosis Factor

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der Muskel Kostimulationsmoleküle wie ICOS-L¹³ und B7-H1 [24][25][28] sowie nicht-klassische MHC-Moleküle (HLA-G¹⁴) [26][27] im Muskel unter bestimmten Bedingungen exprimiert. B7-H1 sowie HLA-G üben eine hemmende Funktion auf die Immunantwort im Muskel aus [29].

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von B7-H3 im Muskel zu charakterisieren.

¹³ Inducible COStimulator - Ligand

¹⁴ Human Leukocyte Antigen - G

2. Ergebnisse

2.1 Originalpublikation „Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis“

Expression of the B7-Related Molecule B7-H1 by Glioma Cells: A Potential Mechanism of Immune Paralysis¹

Sabine Wintterle,² Bettina Schreiner,² Meike Mitsdoerffer, Dagmar Schneider, Lieping Chen, Richard Meyermann, Michael Weller, and Heinz Wiendl³

Department of Neurology [S. W., B. S., M. M., D. S., M. W., H. W.] and Institute of Brain Research [R. M.], University of Tübingen, Medical School, D-72076 Tübingen, Germany, and Department of Immunology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota 55905 [L. C.]

ABSTRACT

Human glioblastoma is a highly lethal tumor that is known for its immune inhibitory capabilities. B7-homologue 1 (B7-H1), a recently identified homologue of B7.1/2 (CD80/86), has been described to exert costimulatory and immune regulatory functions. We investigated the expression and the functional activity of B7-H1 in human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. Although lacking B7.1/2 (CD80/86), all 12 glioma cell lines constitutively expressed B7-H1 mRNA and protein. Exposure to IFN- γ strongly enhanced B7-H1 expression. Immunohistochemical analysis of malignant glioma specimens revealed strong B7-H1 expression in all 10 samples examined, whereas no B7-H1 expression could be detected on normal brain tissues. To elucidate the functional significance of glioma cell-related B7-H1 expression, we performed coculture experiments of glioma cells with alloreactive CD4+ and CD8+ T cells. Glioma-related B7-H1 was identified as a strong inhibitor of CD4+ as well as CD8+ T-cell activation as assessed by increased cytokine production (IFN- γ , interleukin-2, and interleukin-10) and expression levels of the T-cell activation marker (CD69) in the presence of a neutralizing antibody against B7-H1 (mAb 5H1). B7-H1 expression may thus significantly influence the outcome of T-cell tumor cell interactions and represents a novel mechanism by which glioma cells evade immune recognition and destruction.

INTRODUCTION

Accumulating evidence indicates that specific T-cell immune responses can be raised against many tumors (1, 2). Nonetheless, tumor-specific immune responses are not sufficient to eradicate the tumors in the instance of clinical cancer (3, 4). Antigen-induced activation and proliferation of T cells are regulated by both positive and negative costimulatory receptors of the immunoglobulin (Ig) superfamily (5, 6). Abrogation of positive costimulatory activity, mediated by, *e.g.*, B7.1/2/CD28 or ICOS⁴ ligand/ICOS, using monoclonal antibodies and soluble receptors that neutralize costimulatory molecules or targeted disruption of gene expression, results in compromised cellular and humoral immune responses. This can be beneficial in the context of autoimmune disease and transplant rejection (7, 8). The lack of augmentative costimulatory activation can be detrimental, however, if immune responses against cancer are compromised (9). Human glioblastoma is a highly lethal tumor that is paradigmatic for its ability to suppress effective antitumor immune responses (10). The identification of negative immune regulatory

signals on tumor cells, however, has given rise to the hypothesis and hope that their manipulation may lead to enhanced tumor-specific T-cell immunity *in vivo*.

B7-H1, a recently identified homologue of B7.1/2 (CD80/86), has been described to exert costimulatory and immune regulatory functions (5, 6, 11, 12). The costimulation of T cells with B7-H1-Fc fusion protein induces T-cell proliferation and the preferential secretion of IL-10 and IFN- γ (13). Other laboratories, however, showed that B7-H1-Fc inhibited cytokine synthesis because of cell cycle arrest (14, 15). PD-1, a receptor for B7-H1, contains an immune receptor tyrosine-based inhibitory motif, and coligation of PD-1 and the T-cell receptor leads to rapid phosphorylation of Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2, a phosphatase suggested to attenuate T-cell receptor signaling (16).

We here report that glioma cells express high levels of B7-H1 *in vitro* and *in vivo* and that B7-H1 expressed on glioma cells reduces their immunogenicity *in vitro*. B7-H1 is thus a novel mediator that may contribute to the immune inhibitory characteristics of human glioma.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and Reagents. The following primary antibodies were used: antihuman B7-H1 (clone 5H1; Ref. 17); anti-HLA(human leukocyte antigen)-A2 (BB7.2; American Type Culture Collection, Manassas, VA); anti-CD8+-FITC (B9.11; Immunotech, Marseille, France); anti-HLA class I (W6/32); anti-HLA-DR (L243); anti-CD69-PE (CH/4; CALTAG Laboratories, Hamburg, Germany); anti-CD14 (B-A8); anti-CD20 (B9E9); anti-CD56 (anti-NCAM, MY31); anti-CD4+-FITC (RPA-T4); anti-CD80 (BB-1); anti-CD86 (B-T7 (all from BD PharMingen, Heidelberg, Germany); antihuman ICOS; and antihuman ICOS-PE (F44, generously provided by Richard A. Kroczeck, Robert-Koch-Institut, Berlin, Germany). Secondary antibodies and isotype controls were: goat antimouse F(ab')₂-di-chlorotriazinyl-fluorescein; goat antimouse-PE IgG (H+L) F(ab')₂ fragment (Dianova, Hamburg, Germany); mouse IgG1 κ -FITC; mouse IgG1 κ -PE (MOPC-21; Sigma, St. Louis, MO); mouse IgG (Linaris, Wertheim, Germany); IgG1 κ (MOPC-31C and 107.3); and IgG2a (G155-178; BD PharMingen). IFN- γ and TNF- α were from PeprTech EC Ltd. (London, United Kingdom). Normal goat serum was from Dianova (Hamburg, Germany), human IgG (Alphaglobin) was obtained from Grifols (Langen, Germany) and CD3/CD28 beads were from DYNAL Biotech (Hamburg, Germany).

Cell Culture. The human malignant glioma cell lines LN-18, U138MG, U87MG, LN-428, D247MG, T98G, LN-319, LN-229, A172, U251MG, U373MG, and LN-308, kindly provided by Dr. Nicolas de Tribolet (Lausanne, Switzerland), were cultured as described (18). TE671 cells were obtained from American Type Culture Collection.

Immunohistochemistry. Tumor specimens were surgically removed from 9 patients with glioblastoma (WHO grade IV) and 1 patient with a mixed glioma (WHO grade III, female, *n* = 5, age range, 28–89 years, median, 68 years; male *n* = 5, age range, 60–71 years, median, 64 years). One biopsy of normal brain tissue and the normal brain tissue in proximity to the neoplastic cells were used as control tissues. Normal human thymuses were obtained following Institutional Review Board guidelines from 2-day- to 14-year-old children undergoing corrective cardiac surgery. Immunohistochemistry was performed as described previously (18). In brief, frozen sections (20 μ m) were cut, fixed in acetone, and immunostained with anti-B7-H1 antibody (5H1) or

Received 2/6/03; revised 7/29/03; accepted 7/31/03.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Wi 1722/2-1 (to H. W.), NIH Grant CA98721 (to L. C.), Federal Ministry of Education and Research Grant F6-01KS9602, and the Interdisciplinary Center of Clinical Research Tübingen (IZKF) (to M.W.).

² Both authors contributed equally.

³ To whom requests for reprints should be addressed, at Department of Neurology, University of Tübingen, Hoppe-Seyler-Strasse 3, D-72076 Tübingen, Germany. Phone: 49-7071-2982141; Fax: 49-7071-295201; E-mail: heinz.wiendl@uni-tuebingen.de.

⁴ The abbreviations used are: ICOS, inducible costimulator; B7-H1, B7-homolog 1; mAb, monoclonal antibody; IL, interleukin; QRT-PCR, quantitative real-time PCR; PE, phycoerythrin; TNF, tumor necrosis factor; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PD-1, programmed death-1; PD-L1, programmed death-1 ligand; SFI, specific fluorescence index; DC, dendritic cell; CNS, central nervous system.

an isotype control antibody. The reaction product was visualized with the streptavidin-biotin method (reagents from Dako, Hamburg, Germany) using 3,3'-diaminobenzidine (Serva, Heidelberg, Germany) as a substrate. Biopsy specimens stained with immunohistochemistry were assessed independently by two experimentators. The percentage of positively stained glioma cells was quantified from <25, 25–50, 50–75 to >75%.

PBMCs, Purified Lymphocyte Populations, and DCs. PBMCs were isolated from the peripheral blood of normal healthy volunteers (18). CD4+ and CD8+ T cells (> 95%) were purified using microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Coculture experiments were carried out as described previously (18). Cytokines released into the supernatants (human IFN- γ , IL-2, and IL-10) were measured by ELISA (BD PharMingen). The expression of T-cell activation markers was assessed by flow cytometry. Monocytes were obtained from Ficoll-separated PBMC of healthy volunteers. B cells were removed using CD22+ magnetic beads (Miltenyi Biotec), and monocytes were obtained after 1 h adherence step in RPMI 1640 containing 10% FCS at 37°C. Monocytes, >90% pure as assessed by flow cytometry, were cultured in RPMI 1640 containing 10% FCS supplemented with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (100 ng/ml, Leukomax; Sandoz, Basel, Switzerland) and IL-4 (40 ng/ml; PeproTech, Inc., Offenbach, Germany). After 6 days the cells exhibited an immature DC phenotype (CD14– and CD1a+ and HLA-DRlow and CD86low and CD80low/– and CD83–). Maturation was induced by incubation of the immature DCs with lipopolysaccharide (5 μ g/ml, *S. typhi*; Sigma L-7261) or TNF- α (200 units/ml; PeproTech EC Ltd). High levels of surface HLA-DR and costimulatory molecules (CD86 and CD80) identified mature DCs.

Flow Cytometry. Surface expression of immune molecules was quantified by flow cytometry on a fluorescence activated cell sorter (FACSCalibur cytometer; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) using CellQuest software. A total of 10,000 events/antigen was evaluated. Histograms were analyzed by calculating the SFI (geometric mean of the specific antibody fluorescence divided by the geometric mean of the isotype control antibody fluorescence).

Coculture Experiments. Coculture experiments were carried out as described previously (19). Glioma cells were plated in 48-well plates (Costar, Bodenheim, Germany) at a density of 5×10^4 cells/well and cultured in the absence or presence of IFN- γ (500 units/ml) for 24 h to induce MHC class II and B7-H1 expression. After washing the cells, 0.5×10^6 freshly purified alloreactive T cells (CD4+ and CD8+) were added. Cells subsequently were cocultured in RPMI 1640. Where indicated, anti-B7-H1 mAb (5H1) or respective control antibodies (isotype, anti-HLA class I, and anti-HLA-DR) were added to the cocultures to delineate the functional relevance of B7-H1 for glioma-immune cell interactions. For all blocking experiments, the primary antibodies were cross-linked with AffiniPure Fab fragment goat antimouse IgG (H+L; Jackson ImmunoResearch, Dianova). For the measurement of cytokine production (human IFN- γ , IL-2, and IL-10), supernatants were removed after 24–48 h and analyzed by ELISA (BD PharMingen). For measurement of T-cell activation markers, cells were harvested and subjected to flow cytometric analysis.

RNA Extraction, cDNA Synthesis, and QRT-PCR. Total RNA extraction and first strand cDNA synthesis were performed by standard methods. Quantitative analysis of gene expression was performed by QRT-PCR using the ABI prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described previously (19). cDNA templates were amplified using Sybr Green PCR Master Mix (containing hot start-AmpliTaqGold, Sybr Green PCR buffer 2 \times , MgCl₂, and deoxynucleotide triphosphate; Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom). Reverse transcription-PCR of cDNA specimens was conducted in a total volume of 15 μ l with Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems) with primers at optimized concentrations. Thermal cycler parameters were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s followed by annealing and extension at 60°C for 1 min. Data were analyzed with the ABI Prism 7000 Sequence detection system. Absolute quantification of mRNA content was performed with standard curves for 18S and B7-H1 using plasmids (amplification efficiency 90–100%, linear regression analysis 0.99). Relative quantification was performed with the 2^{– $\Delta\Delta$ C_t}-method (see Applied Biosystems User bulletin). Samples were normalized to 18S rRNA to account for the variability in the initial concentration of the total RNA and conversion efficiency of the reverse transcription

reaction. Oligonucleotides used in this study are listed below: 18S, 18s-for: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' and 18s-rev: 5'-GCTGGGAATTACCGCGGCT-3'; HLA-DR, HLA-DR α -for: 5'-TGAAGAATTTGGACGATTGTC-3' and HLA-DR α -rev: 5'-GGAGGTACATTGGTGATCGG-3'; and B7-H1, B7-H1-for: 5'-TCAATGCCCATACAACAAA-3' and B7-H1-rev: 5'-TGCTTGCTCCAGATGACTTCG-3'.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed with one sample *t* test (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01).

RESULTS

B7-H1 Expression in Human Glioma Cell Lines. Twelve human glioma cell lines were tested for B7-H1 mRNA expression in the absence or presence of IFN- γ (500 units/ml, 48 h) by QRT-PCR. All glioma cell lines expressed low levels of B7-H1 mRNA constitutively. In the presence of IFN- γ , B7-H1 transcription was increased from 1.7-fold (LN-428) to 75-fold (LN-319; mean 21.64 ± 21.68 SD; Fig. 1A). In contrast to IFN- γ , TNF- α had no effect on B7-H1 mRNA expression (data not shown). Flow cytometry revealed constitutive B7-H1 cell surface expression in all 12 glioma cell lines examined. After stimulation with IFN- γ , B7-H1 expression was enhanced 1.1-fold (LN-428) to 9.3-fold (D247MG) as assessed by SFI ratios (Fig. 1B). The expression of HLA class I antigens, HLA-DR antigens, B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86), and their inducibility by IFN- γ were assessed in parallel. Although constitutively expressing HLA class I antigens, inducibly or constitutively expressing HLA-DR antigens, glioma cells lack B7.1/2 (CD80/86) mRNA and protein [Table 1, Fig. 2; (Refs. 18, 20)]. In contrast to the tested glioma cells, TE671, a rhabdomyosarcoma cell line, showed no constitutive expression of B7-H1 mRNA or protein (Fig. 1A).

B7-H1 Expression by Glioma Cells *in Vivo*. Using immunohistochemistry, B7-H1 protein expression was detected in all 9 glioblastoma specimen (WHO IV) and 1 mixed glioma (WHO III) specimen. More than 50% of the tumor cells expressed B7-H1 in the glioblastoma specimens (range, 50–90%). B7-H1-positive cells were evenly scattered throughout the specimens. In contrast, no B7-H1 was found in normal brain tissue adjacent to tumor tissue or in normal brain biopsy specimen. Human thymus was used as a positive control (Ref. 17; Fig. 3).

Functional Relevance of B7-H1 Expression: Inhibition of T-Cell Cytokine Production and Expression of Activation Markers. To investigate the functional significance of endogenous B7-H1 expressed on glioma cells, we performed coculture experiments with purified T-helper cell subsets in the absence and presence of a blocking antibody against B7-H1. In addition to B7-H1, LN-229 glioma cells exhibit high constitutive expression levels of HLA class I and HLA-DR antigens but do not express CD80 and CD86 (Table 1, Figs. 1, 2, and 4A). Upon coculture of purified CD4+ T cells with LN-229 glioma cells, HLA-DR antigens interact with the T-cell receptor on CD4+ T cells, leading to T-cell activation and cytokine production. Correspondingly, alloreactive CD8+ T cells interact with HLA class I antigens on glioma cells, leading to T-cell activation. The release of cytokines (IFN- γ , IL-2, and IL-10) into the culture supernatant was assessed by ELISA at times indicated. Freshly purified, alloreactive unprimed CD4+ and CD8+ T-cell subsets were cocultured with the glioma cells for 24 or 48 h. In the presence of anti-B7-H1 antibody, cytokine production was enhanced in cocultures of glioma cells and CD4+ or CD8+ T cells (relative change in cytokine production for IFN- γ : CD4+ T cells $310 \pm 53.9\%$, *P* = 0.017; CD8+ T cells: $159 \pm 46.1\%$, *P* = 0.270; IL-2: CD4+ $176 \pm 16.8\%$, *P* = 0.011; CD8+ $150 \pm 46.4\%$, *P* = 0.338; Fig. 4A). The inhibitory effects of B7-H1 on IFN- γ and IL-2 production were most prominent for CD4+

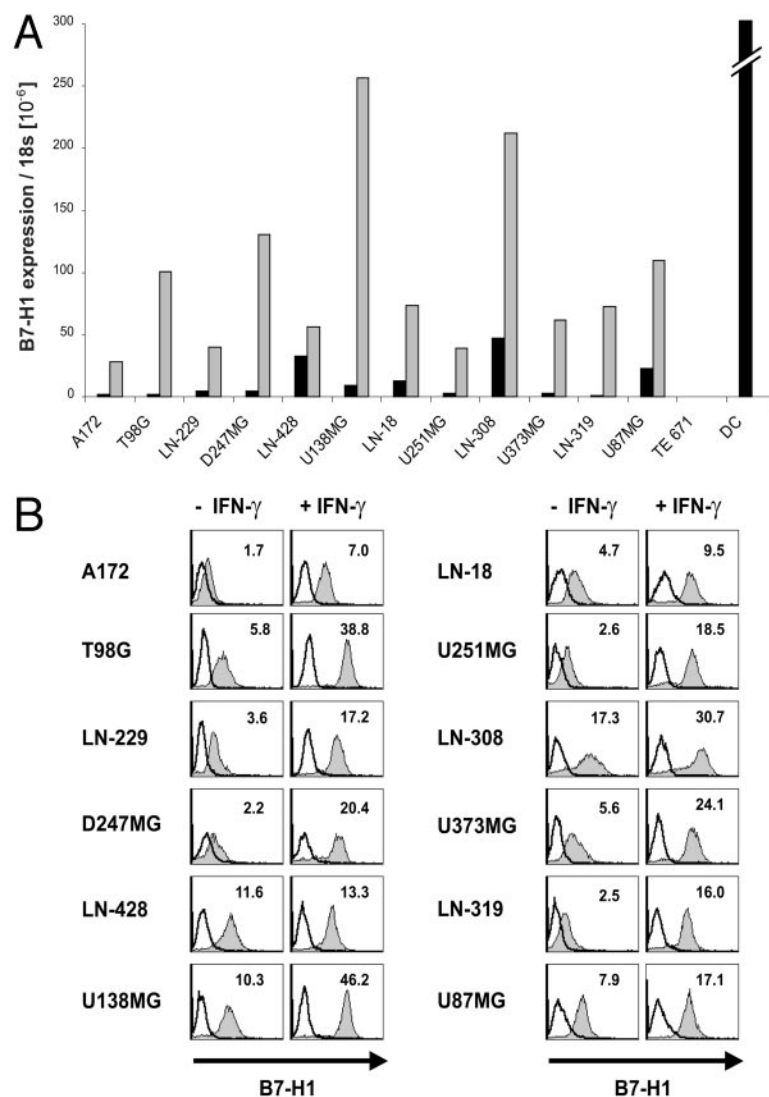


Fig. 1. Human glioma cells express B7-H1 mRNA and protein. *A*, expression of B7-H1 (PD-L1) mRNA was analyzed by QRT-PCR in glioma cells cultured in the absence (■) or presence of IFN- γ (500 units/ml, 48 h; □). Absolute quantification of B7-H1 mRNA was performed. Data are presented as specific gene expression relative to 18S. Lipopolysaccharide-matured DCs were used as a positive control for B7-H1 expression, TE671 muscle rhabdomyosarcoma cells served as a negative control. *B*, B7-H1 protein expression at the cell surface was determined by flow cytometry using mAb 5H1 (■). □ represent isotype controls. The numbers indicate the SFI.

T cells. CD8+ T cells were also inhibited, but the changes in cytokine production did not reach the level of statistical significance. The effects on IL-10 production differed between different donors. In general, B7-H1 blockade increased IL-10 levels in the cocultures, but

Table 1 Expression of HLA class I and HLA-DR antigens in glioma cell lines in the absence or presence of IFN- γ ^a

	HLA class I		HLA-DR			
	SFI		SFI		mRNA	
	- IFN- γ	+ IFN- γ	- IFN- γ	+ IFN- γ	- IFN- γ	+ IFN- γ
A172	21.9	17.2	1.0	6.3	0.000	0.176
T98G	191.1	202.2	1.0	117.8	0.000	8.449
LN-229	134.3	271.9	193.5	303.7	3.071	12.941
D247MG	79.0	148.0	1.0	5.5	0.000	0.739
LN-428	19.6	40.9	1.0	14.4	0.000	0.169
U138MG	38.1	52.6	1.0	1.1	0.000	1.584
LN-18	22.0	43.9	1.0	5.3	0.000	1.156
U251MG	16.4	33.6	1.0	5.8	0.000	1.509
LN-308	5.2	13.5	1.0	1.0	0.000	0.043
U373MG	105.0	240.0	1.4	5.3	0.000	5.831
LN-319	13.3	21.5	2.4	31.0	0.000	1.010
U87MG	8.0	15.8	1.9	10.1	0.000	0.254

^a Protein expression of HLA class I and HLA-DR antigens was quantified by flow cytometry using anti-HLA class I mAb W6/32 and anti-HLA-DR mAb L243 and expressed as SFI [modified from (18)]. mRNA expression of HLA-DR- α was quantified by relative QRT-PCR. TNF- α -matured DCs were used as a positive control and set to 100% (data not shown). Data are expressed as a percentages relative to this positive control.

this effect was not significant (CD4+ T cells: $154.8 \pm 25.3\%$, $P = 0.096$; CD8+ T cells: $119.2 \pm 12.6\%$, $P = 0.201$). Anti-HLA-DR mAb L243 and anti-HLA-A, HLA-B, and HLA-C mAb W6/32 were used as positive controls to suppress HLA class I- and HLA-DR-restricted activation and cytokine production by CD4+ and CD8+ T cells (Fig. 4A).

The B7-H1-mediated inhibition of cytokine production was paralleled by corresponding changes in the expression of the T-cell activation marker CD69. CD4+ and CD8+ T cells were cocultured with LN-229 cells in the absence or presence of anti-B7-H1 mAb and subsequently stained for T-cell activation markers CD69 and ICOS. Inhibitory effects of endogenous B7-H1 on T-cell activation were documented by increased levels of CD69 in the presence of anti-B7-H1 mAb. In contrast, there was no effect on the expression of ICOS (Fig. 4B). Similar experiments were performed with another glioma cell line, T98G. In addition to B7-H1, T98G glioma cells exhibit high constitutive expression levels of HLA class I but do not express CD80, CD86, or HLA-DR antigens (Fig. 1, Table 1). Before the coculture experiments, glioma cells were pretreated with IFN- γ (500 units/ml, 24 h) to up-regulate HLA-DR antigen and B7-H1 expression. Similar data on the inhibitory effects of B7-H1 on CD4+ and CD8+ T-cell cytokine production and activation were achieved (data not shown).

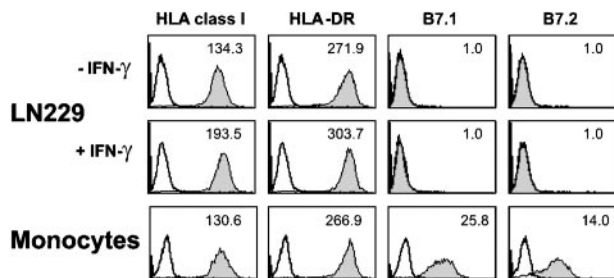


Fig. 2. Cell surface expression of MHC antigens and B7 costimulatory molecules in LN-229 glioma cells. Cell surface expression of HLA class I, HLA-DR, B7.2 (CD86), and B7.1 (CD80) was assessed in LN-229 glioma cells cultured in the absence or presence of IFN- γ (500 units/ml, 48 h) using mAb W6/32 (anti-HLA class I), mAb L243 (anti-HLA-DR), mAb B-T7 (anti-CD86), or mAb BB-1 (anti-CD80). Human monocytes stimulated with IFN- γ (500 units/ml; 24 h) were used as a positive control. Histograms show staining with the designated antibodies (■) overlaid with the respective isotype controls (□). The numbers indicate the SF1.

DISCUSSION

Cancer progression has been attributed to a variety of immune evasion strategies (21). Glioblastoma is a paradigmatic cancer that inhibits antitumor immune responses by a variety of immune suppressive mechanisms such as the release of TGF- β (22), IL-10 (23), the expression of CD95L (24, 25), CD70 (20), or HLA-G (18). Immune-oriented therapeutic strategies to treat glioma either try to abolish immune suppressive mechanisms or to enhance antitumor immune responses (10, 26). We here describe that B7-H1, a costimulatory molecule of the B7 family, is constitutively expressed in glioma cells *in vitro* (Fig. 1), as well as in brain tumor specimens *in vivo* (Fig. 3). Using alloreactive coculture assays *in vitro*, we demonstrate that B7-H1 significantly impairs antitumor immune responses, as shown here at the level of T-cell cytokine production and activation (Fig. 4).

Under physiological and noninflammatory conditions, B7-H1 expression *in vivo* is mainly observed on professional antigen-presenting cells as monocytes and DCs (13, 17). Under inflammatory conditions, however, B7-H1 expression is no longer restricted to antigen-presenting cells, but also found on other cell types in nonlymphoid tissues, *e.g.*, endothelial cells and muscle (13, 14, 27–30).

Our study provides the first evidence for the expression of B7-H1

within the brain *in vivo*. All malignant glioma specimens expressed B7-H1, whereas normal CNS tissue adjacent to the neoplastic cells and one cortical biopsy without pathological alterations did not exhibit B7-H1 immunoreactivity (Fig. 3). This observation was paralleled by the demonstration of strong constitutive B7-H1 expression in all tested cultured glioma cell lines (Fig. 1). It remains elusive, at present, how and when glioma cells acquire B7-H1 expression. Consistent with previous studies (*e.g.*, Ref. 13), RNA and protein levels of B7-H1 were additionally up-regulated in the presence of inflammatory cytokines such as IFN- γ , whereas TNF- α had no such effect (Fig. 1). These data corroborate and extend two recent studies showing B7-H1 expression on melanoma cells and carcinoma cells of lung, ovary, and colon, as well as in some tumor cell lines of non-CNS origin (17, 31). More detailed investigations are warranted to elucidate the involvement of B7-H1 and its receptor interactions in other inflammatory and noninflammatory CNS pathologies.

Glioma-related B7-H1 expression was identified as a strong inhibitor of antitumor immune responses as assessed under alloreactive coculture conditions *in vitro*. In the presence of a neutralizing antibody to B7-H1 (mAb 5H1), the levels of IFN- γ and IL-2 produced by CD4+ and CD8+ T cells were markedly enhanced, an observation that was paralleled by increased expression of the T-cell activation marker CD69 (Fig. 4). Under certain experimental conditions, B7-H1 in the form of an immunoglobulin (Ig) fusion protein (B7-H1-Ig) or cell-associated B7-H1 together with a mAb against CD3 can exert costimulatory functions on T cells *in vitro* (13, 32). However, recent studies indicate that prolonged B7-H1 stimulation of activated T cells leads to increased apoptosis (17) and that ligation of PD-1 by B7-H1 inhibits proliferation and cytokine production by activated T cells (14, 15). It has also recently been shown that B7-H1 expressed on DCs exerts strong immune inhibitory effects on autologous T-cell activation. B7-H1 has therefore been proposed as an important principle involved in the induction and maintenance of T-cell anergy under physiological conditions (31, 33). Furthermore, in addition to B7-H1-PD-1 interactions, inhibitory effects of B7-H1 are mediated via yet unidentified non-PD-1 receptors (17, 34). Our study is in line with the concept of an overall negative regulatory function of B7-H1 for T-cell activation and proposes glioma-related B7-H1 expression as a potential mechanism of immune inhibition in the CNS. B7-H1 expressed on

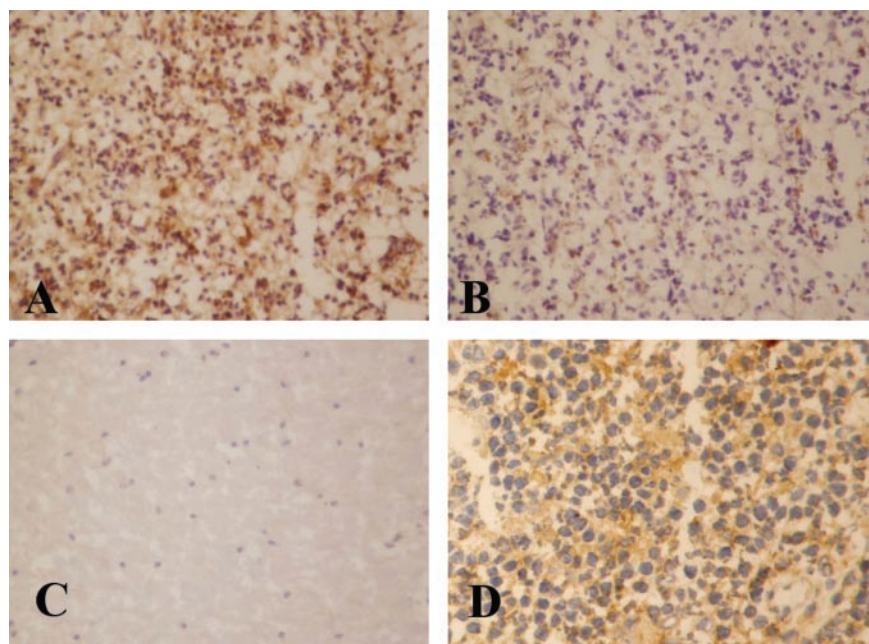


Fig. 3. Analysis of B7-H1 expression in brain tumor specimens. Frozen tissue sections of a glioblastoma (A and B), normal brain (C), or human thymus (D) were immunostained with the B7-H1-specific mAb 5H1 (A, C, and D) or IgG isotype control (B). Human thymus served as a positive control (D). A–C, $\times 200$; D, $\times 400$.

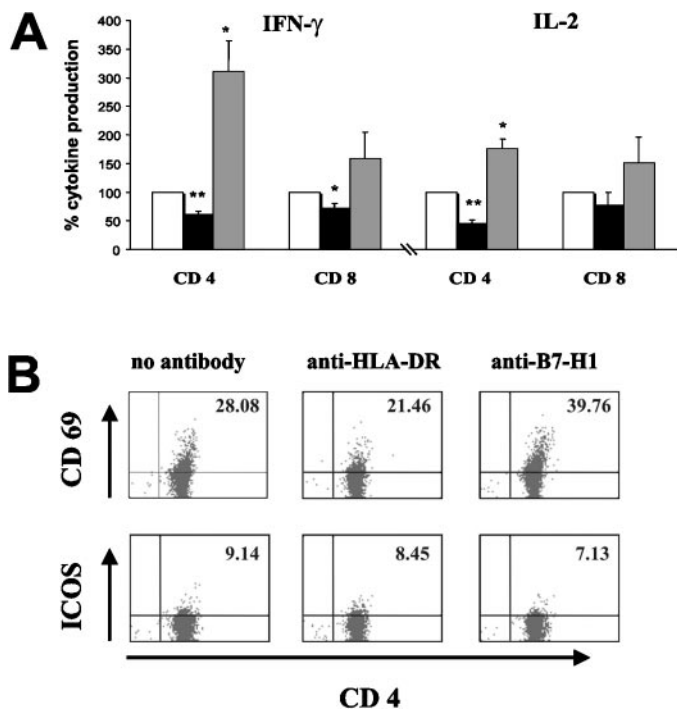


Fig. 4. Functional consequences of B7-H1 expression for cytokine expression and T-cell activation. **A**, modulation of cytokine production by B7-H1 was assessed by coculturing LN-229 glioma cells with allogeneic CD4+ or CD8+ T cells. LN-229 were cultured with purified CD4+ T cells (CD4) or CD8+ T cells (CD8) in the presence of an isotype control antibody (MOPC-21, 6 μ g/ml; \square), anti-HLA-DR mAb (L243, 20 μ g/ml)/anti-HLA class I (W6/32; 20 μ g/ml) antibody (\blacksquare), or anti-B7-H1 mAb (5H1, 6 μ g/ml; \blacksquare). Cytokine production was assessed by ELISA of the supernatant at 48 h of coculture. Cytokine synthesis measured in the isotype control was set to 100%. Data are pooled from at least five independent experiments and expressed as change of cytokine levels relative to the isotype control (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). **B**, modulation of T-cell activation marker expression by glioma-related B7-H1 was assessed by flow cytometry. CD69 and ICOS protein expression on T cells were determined after 48-h coculture of LN-229 cells with allogeneic CD4+ T cells by flow cytometry using mAb anti-CD69 and anti-ICOS. LN-229 cells were cultured under the same conditions as indicated in **A**. *Dot blots* show expression of T-cell activation markers. Percentages of stained cells are indicated in the quadrants. Data are representative for experiments performed at least five times with similar results.

glioma cells probably inhibits T-cell activation by engagement of a non-PD-1 receptor because mAb 5H1, the neutralizing antibody used in our blocking experiments (Fig. 4), does not interfere with the binding of B7-H1 to PD-1 receptor (34).

Tumor-associated B7-H1 expression was recently shown to promote T-cell apoptosis and proposed as a potential mechanism of immune evasion by certain non-CNS tumors (17, 35). B7-H1-mediated induction of T-cell apoptosis may be executed by multiple mechanisms such as triggering IL-10 secretion or involvement of CD95L (17). However, under our experimental conditions, we did not detect a direct proapoptotic effect of glioma-related B7-H1 on CD4+ or CD8+ cells (data not shown). The use of different experimental systems investigating the significance of tumor-associated B7-H1 expression may explain these differences. Tumor antigen-specific T-cell clones were used by Dong *et al.* (17), whereas our experimental approach aimed at demonstrating the relevance of B7-H1 for glioma immune cell interactions under primary alloreactive coculture conditions. T-cell clones are known for their high susceptibility to activation-induced cell death, a mechanism that is of minor importance in our experimental system. Along with this, the ability to induce apoptosis in freshly isolated lymphocytes depends on the level of preactivation. Unstimulated responder cells were cocultured with B7-H1-bearing glioma cells here, thus reducing their susceptibility to apoptosis. Of note, the influence of B7-H1 on IL-2 production dif-

fered between CD4+ and CD8+ T cells (Fig. 3). This can potentially be explained by the different requirements on costimulation between CD4+ and CD8+ T cells. Although there is consensus on the necessity of a costimulatory signal for CD4+ T-helper functions such as T-cell proliferation promoted by IL-2, the influence of costimulation on CD8+ cytotoxic T cells for the exertion of effector functions is less clear.

Our *in vitro* data concerning T-cell inhibition by glioma-related B7-H1 indicate that this costimulatory molecule inhibits T-cell growth and cytokine production. Therefore, glioma-related B7-H1 expression is likely to influence both primary and secondary phases of antitumor immune responses under *in vivo* conditions. B7-H1 could interfere with mounting primary antitumor immune responses via inhibition of T-cell priming and DC function (14, 36). Furthermore, B7-H1 could protect glioma cells from direct immune attack by antigen-specific cytotoxic T cells at the effector level (17, 35). In any event, the present results strongly suggest that effective blockade of B7-H1 interactions with immune effector cells *in vivo* should provide a promising strategy of immunotherapy for selected tumors expressing B7-H1.

REFERENCES

- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**: 337–365, 1994.
- Tureci, O., Sahin, U., and Pfreundschuh, M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol. Med. Today*, **3**: 342–349, 1997.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. Cancer immunoevasion: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.*, **3**: 991–998, 2002.
- Whiteside, T. L. Immune responses to malignancies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**: S677–S686, 2003.
- Coyle, A. J., and Gutierrez-Ramos, J. C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.*, **2**: 203–209, 2001.
- Carreno, B. M., and Collins, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**: 29–53, 2002.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**: 233–258, 1996.
- Chambers, C. A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol.*, **22**: 217–223, 2001.
- Chen, L., Ashe, S., Brady, W. A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Ledbetter, J. A., McGowan, P., and Linsley, P. S. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T-lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, **71**: 1093–1102, 1992.
- Walker, P. R., Calzascia, T., and Dietrich, P. Y. All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumours. *Immunology*, **107**: 28–38, 2002.
- Liang, L., and Sha, W. C. The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.*, **14**: 384–390, 2002.
- Sharpe, A. H., and Freeman, G. J. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**: 116–126, 2002.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [see comments]. *Nat. Med.*, **5**: 1365–1369, 1999.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkov, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., and Honjo, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, **192**: 1027–1034, 2000.
- Carter, L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. J., and Carreno, B. M. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.*, **32**: 634–643, 2002.
- Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., and Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B-cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 13866–13871, 2001.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., and Chen, L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.*, **8**: 793–800, 2002.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Wischhusen, J., Hofmeister, V., Bornemann, A., Meyermann, R., Weiss, E., Melms, A., and Weller, M. A functional role of HLA-G-expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J. Immunol.*, **268**: 4772–4780, 2002.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Melms, A., Lochmuller, H., Hohlfield, R., and Weller, M. Muscle fibers and cultured muscle cells express the B7.1/2 related

- costimulatory molecule ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain*, *126*: 1026–1035, 2003.
20. Wischhusen, J., Jung, G., Radovanovic, I., Beier, C., Steinbach, J. P., Rimner, A., Huang, H., Schulz, J. B., Ohgaki, H., Aguzzi, A., Rammensee, H. G., and Weller, M. Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res.*, *62*: 2592–2599, 2002.
 21. Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., and Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.*, *74*: 181–273, 2000.
 22. Weller, M., and Fontana, A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF- β , T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res. Rev.*, *21*: 128–151, 1995.
 23. Zou, J. P., Morford, L. A., Chougnet, C., Dix, A. R., Brooks, A. G., Torres, N., Shuman, J. D., Coligan, J. E., Brooks, W. H., Roszman, T. L., and Shearer, G. M. Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J. Immunol.*, *162*: 4882–4892, 1999.
 24. Saas, P., Walker, P. R., Hahne, M., Quiquerez, A. L., Schnuriger, V., Perrin, G., French, L., Van Meir, E. G., de Tribolet, N., Tschopp, J., and Dietrich, P. Y. Fas ligand expression by astrocytoma *in vivo*: maintaining immune privilege in the brain? *J. Clin. Investig.*, *99*: 1173–1178, 1997.
 25. Weller, M., Kleihues, P., Dichgans, J., and Ohgaki, H. CD95 ligand: lethal weapon against malignant glioma? *Brain Pathol.*, *8*: 285–293, 1998.
 26. Paul, D. B., and Kruse, C. A. Immunologic approaches to therapy for brain tumors. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, *1*: 238–244, 2001.
 27. Eppihimer, M. J., Gunn, J., Freeman, G. J., Greenfield, E. A., Chernova, T., Erickson, J., and Leonard, J. P. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation*, *9*: 133–145, 2002.
 28. Mazanet, M. M., and Hughes, C. C. B7-h1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T-cell cytokine synthesis. *J. Immunol.*, *169*: 3581–3588, 2002.
 29. Petroff, M. G., Chen, L., Phillips, T. A., and Hunt, J. S. B7 family molecules: novel immunomodulators at the maternal-fetal interface. *Placenta*, *23* (Suppl. A): S95–S101, 2002.
 30. Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Lochmuller, H., Melms, A., and Weller, M. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J.* 2003 Aug 15 [Epub ahead of print]: 10.1096/fj.03-0039fje. Published online August 15, 2003.
 31. Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F. R., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., Greenfield, E. A., and Freeman, G. J. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T-cell activation and cytokine production. *J. Immunol.*, *170*: 1257–1266, 2003.
 32. Tamura, H., Dong, H., Zhu, G., Sica, G. L., Flies, D. B., Tamada, K., and Chen, L. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*, *97*: 1809–1816, 2001.
 33. Selenko-Gebauer, N., Majdic, O., Szekeres, A., Hofler, G., Guthann, E., Korthauer, U., Zlabinger, G., Steinberger, P., Pickl, W. F., Stockinger, H., Knapp, W., and Stockl, J. B7-h1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T-cell anergy. *J. Immunol.*, *170*: 3637–3644, 2003.
 34. Wang, S., Bajorath, J., Flies, D. B., Dong, H., Honjo, T., and Chen, L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J. Exp. Med.*, *197*: 1083–1091, 2003.
 35. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *99*: 12293–12297, 2002.
 36. Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K. L., Daniel, B., Zimmermann, M. C., David, O., Burow, M., Gordon, A., Dhurandhar, N., Myers, L., Berggren, R., Hemminki, A., Alvarez, R. D., Emilie, D., Curiel, D. T., Chen, L., and Zou, W. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.*, *9*: 562–567, 2003.

2.2 Expression und funktionelle Rolle von B7-H3 im Muskel

Expression von B7-H3 im Muskel

Humane Myoblasten (30/02 und 99/02) [26] und TE671, eine Rhabdomyosarkomzelllinie mit phänotypischen Charakteristika von Muskelzellen bei stabilem Wachstum, wurden mit Hilfe einer Western Blot Analyse auf das Vorkommen von B7-H3 Protein überprüft. In Abb. 2.1 sind die Ergebnisse dargestellt. 624mel B7-H3 Transfektanten [12] wurden hierbei als Positivkontrolle verwendet.

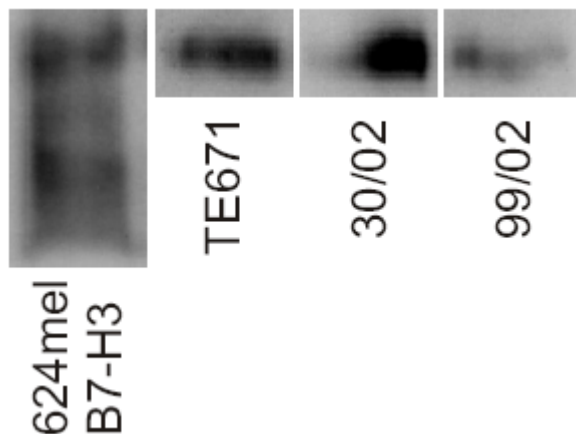


Abb. 2.1 Myoblasten exprimieren B7-H3 Protein: Western Blot Analyse von Zelllysaten

Dargestellt ist B7-H3 Protein in Zelllysaten von TE671, 30/02 und 99/02 in der Western Blot Analyse. 624mel B7-H3 Transfektanten wurden als Positivkontrolle verwendet.

Es wurden Proteinlysate aus Trockenpellets von TE671, 30/02 und 99/02 sowie 624mel B7-H3 Transfektanten mit 1%iger NP40-Lösung (PMSF, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin enthalten) hergestellt. Danach wurden jeweils 20µg des Proteinlysates auf einem 10%igen Acrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde anschließend in einer Lösung mit 5% Milchpulver für mindestens 1h geblockt. Biotinylierter anti-human B7-H3 Antikörper (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) wurde über 1h mit der Membran inkubiert, danach drei Mal gewaschen und mit einem Streptavidin poly-HRP Antikörper (Sanquin Reagents, Amsterdam, Niederlande) für weiter 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde zur Detektion das ECL Western blotting analysis system (Amersham Bioscience) benutzt. Der Film wurde nach 3 min Inkubation entwickelt.

Diese Befunde wurden mit einer zweiten Methode, der Durchflusszytometrie, bestätigt. Muskelzellen exprimieren B7-H3 Protein auf der Zelloberfläche (Abb. 2.2).

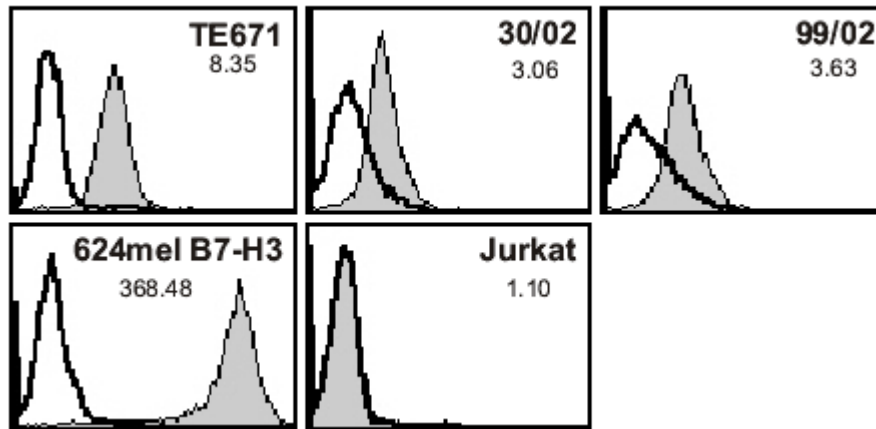


Abb. 2.2 Muskelzellen exprimieren B7-H3 Protein: durchflusszytometrische Analyse

Die Zelllinien TE671, 30/02 und 99/02 wurden mit anti-human B7-H3 Antikörper (Lot HJA01) und als Kontrolle mit normal goat IgG (Lot XS05; jeweils R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) angefärbt. Beide Antikörper sind biotinyliert, sodass zur Detektion Streptavidin-PE (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) als zweiter Antikörper verwendet wurde. Gleiches Verfahren wurde bei 624mel B7-H3 Transfektanten (Positivkontrolle) und Jurkat (Negativkontrolle) angewendet. Die Oberflächenexpression wurde mit einem FACSCalibur Zytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen und mit CellQuest Software in Form von Histogrammen ausgewertet. Die angegebenen Zahlen stellen den Specific Fluorescence Index SFI dar (Geometrischer Mittelwert des spezifischen Antikörpers dividiert durch den des Kontrollantikörpers). Ein SFI-Wert größer als 1.5 wurde als positiv gewertet. Die Verteilung des B7-H3 Antikörpers ist grau, die des Kontrollantikörpers weiß im Histogramm dargestellt.

B7-H3 kommt somit bei den getesteten Myoblasten 99/02 und 30/02 und der Rhabdomyosarkomzelllinie TE671 als Protein auf der Zelloberfläche vor. Es konnte gezeigt werden, dass der benutzte Antikörper, vom Hersteller für Western Blot und Immunhistochemie empfohlen, auch in der Durchflusszytometrie den Expressionsnachweis erbringt. Um zu überprüfen, ob sich das Expressionsniveau von B7-H3 auf der Zelloberfläche unter bestimmten Bedingungen ändert, wurden die Zellen mit IFN- γ (500U/ml), TNF- α (500U/ml), IL-4 (40ng/ml) oder IL-10 (20ng/ml) über 48h inkubiert und anschließend

analysiert. B7-H3 zeigte sich dabei nicht wesentlich reguliert (Daten nicht gezeigt).

Funktionelle Bedeutung von B7-H3

Zur Beantwortung der Frage, welche Rolle B7-H3 für Muskel-Immunezellinteraktion in der muskulären Immunantwort spielt, wurden siRNA (short interfering RNA) [30] Transfektanten generiert. Hierfür wurde die Basensequenz 590-608 der Homo Sapiens B7-Homolog 3 mRNA (5'-ACGAGCAGGGCTTGTGTTGA-3') ausgewählt. Kurz erläutert bedeutet dies, dass sich in der Zelle die siRNA an die entsprechende Sequenz der zelleigenen B7-H3 mRNA anlagert. So kommt es zur Bildung von doppelsträngiger RNA, die von Kontrollmechanismen der Zelle erkannt und abgebaut wird, bevor die mRNA in Protein überführt werden kann. Theoretisch lässt sich damit in der Zelle die Synthese ausgewählter Proteine vollständig unterdrücken. In den generierten Transfektanten zeigte sich eine deutliche Herunterregulation von B7-H3 im Vergleich zu Kontrolltransfektanten [Tabelle 2.1].

Folgende Oligonukleotide (Metabion GmbH, München, Deutschland) wurden in ein pSUPERpuro Plasmid [31] geklont:

B7H3-frw: 5'-GATCCCCACGAGCAGGGCTTGTGTTGAttcaagagaTCAAACAAG
CCCTGCTCGTTTTTTTGGAAA-3'

B7H3-rev: 5'-TCGATTTCCAAAAAACGAGCAGGGCTTGTGTTGAtctcttgaaTCAA
ACAAGCCCTGCTCGTGGG-3'.

Die Zelllinie TE671 (Wildtyp) wurde anschließend mit diesem Plasmid unter Benutzung von FuGene (Roche Diagnostics Corporation GmbH, Mannheim, Germany) transfiziert. Als Kontrollplasmid diente pBABEpuro [31]. Nach erfolgreicher stabiler Transfektion wurden die Zellen mit 2µg/ml Puromycin (Cayla – InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich) selektiert. Die so erhaltenen Transfektanten wurden B7-H3 low (B7-H3 siRNA) und B7-H3 high (Kontrollplasmid) benannt. In Tabelle 2.1 ist die Charakterisierung der Transfektanten mit Hilfe der Durchflusszytometrie dargestellt. Die B7-H3

Expression auf der Zelloberfläche konnte mit dieser Technik ungefähr halbiert werden. Zur genauen Charakterisierung für die folgenden funktionellen Versuche wurde auch die MHC Klasse I Expression (Antikörperklon W6/32) dargestellt. Die Zahlen zeigen den SFI¹⁵ an.

Zwei ausgewählte Transfektanten wurden für funktionelle Versuche im Folgenden verwendet (B7-H3 high, B7-H3 low).

Tabelle 2.1 Durchflusszytometrie Analyse der Transfektanten

	SFI values	
	B7-H3	MHC class I
B7-H3 high	8.88	93.02
B7-H3 low	4.32	85.92

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle von B7-H3 wurden Zytotoxizitätsassays mit spezifischen CD8+ Effektor-T-Zellen benutzt. Dazu wurden 10⁶ TE671 Wildtyp-Zellen in einer 75cm² Gewebekulturflasche ausplattiert und 10⁸ alloreaktive PBMC (Leukozyten aus dem peripheren Blut, isoliert aus Buffycoats freiwilliger gesunder Blutspender der örtlichen Blutbank) in 10ml RPMI (zusätzlich 10% FCS, 1% Penicillin und Streptomycin) hinzugefügt. An Tag 2, 4, 6 und 8 wurden nochmals 2x10⁵ TE671 Wildtyp-Zellen in den Ansatz dazugegeben. Die TE671 Wildtyp-Zellen waren nach dieser Zeit fast vollständig lysiert worden. An Tag 9 wurden aus den PBMC CD8+ T-Zellen (>95% Reinheit) mit Hilfe von MACS[®] CD8 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) positiv aufgereinigt. Diese CD8+ T-Zellen wurden anschliessend als Effektor-T-Zellen in einem alloreaktiven Zytotoxizitätsversuch mit den B7-H3 low und B7-H3 high TE671 Transfektanten getestet. Die lytische Aktivität wurde mittels DELFIA[®] EuTDA Cytotoxicity Test (PerkinElmer Life Science, Boston, USA, Anwendung gemäß den Anweisungen des Herstellers) ausgelesen.

¹⁵ SFI – Specific Fluorescence Index

B7-H3 auf Zielzellen führte hierbei zu einer Inhibition der Lyse durch CD8+ zytotoxische T-Zellen. Der beobachtete Effekt war konstant über die gewählten Effector-Target-Verhältnissen zu sehen. In Abb. 2.3 ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches dargestellt.

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass B7-H3 in hoher Konzentration auf der Zelloberfläche einen hemmenden Effekt auf die lytische Aktivität von CD8+ T-Zellen in vitro hat.

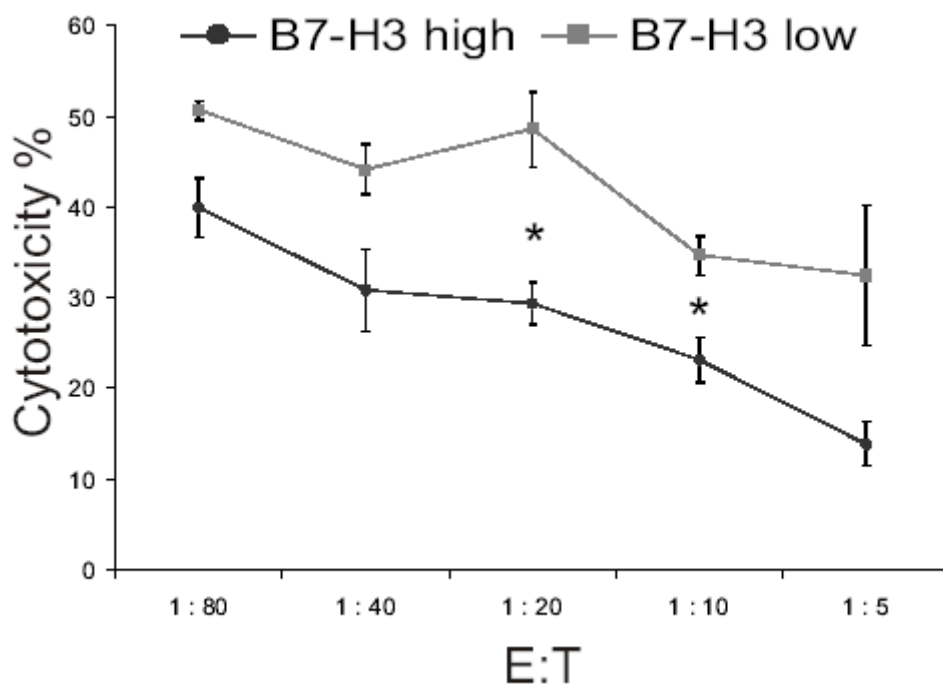


Abb. 2.3 Einfluss von Muskel-deriviertem B7-H3 auf die Zytotoxizität von CD8+ Effektor-T-Zellen

B7-H3 low TE671 Transfektanten werden besser von spezifischen CD8+ Effektor-T-Zellen lysiert. Dargestellt ist die Zytotoxizität in Prozent bei verschiedenen Effector-Target-Verhältnissen. Es wurden jeweils 5×10^3 Zielzellen (TE671 Transfektanten) verwendet. Die Zytotoxizität in Prozent wurde mit folgender Formel berechnet: $([\text{spezifische Lyse} - \text{spontane Lyse}] / [\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse}]) \times 100$. Angegeben ist der Mittelwert von Triplikaten mit Standardfehler. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, insgesamt wurden die Versuche mindestens dreimal auf identische Weise mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. (*, $p < 0,05$; statistische Analyse mit einem 2-seitigen T-Test)

Der Projektteil 'Die Rolle von B7-H3 im Muskel' kann folgendermaßen charakterisiert werden: B7-H3 Protein ist auf der Zelloberfläche von humanen Myoblasten und TE671 exprimiert. Es scheint im Gegensatz zu anderen beschriebenen Kostimulationsmolekülen (ICOS-L und B7-H1) nicht einer regulierenden Kontrolle durch entzündliches Milieu (Zytokine und andere Botenstoffe) zu unterliegen.

Mit Hilfe der siRNA Technologie konnten Transfektanten der Rhabdomyosarkomzelllinie TE671 hergestellt werden, bei denen die B7-H3 Expression auf etwa die Hälfte im Vergleich zu Kontrolltransfektanten reduziert war. Der Versuchsteil, der die funktionelle Rolle von B7-H3 untersuchte, zeigt, dass B7-H3 in hoher Konzentration auf der Zelloberfläche inhibitorisch auf zytotoxische CD8+ T-Zellen wirkt.

3. Zusammenfassung

3.1 Expression und Relevanz von B7-H1 in humanen Gliomen

B7-H1, auch PD-L1 genannt, wurde erst vor kurzem als ein neues Mitglied der B7-Familie von Kostimulationsmolekülen entdeckt. Im Gegensatz zu den klassischen Molekülen CD80 und CD86, die ausschließlich im lymphatischen Gewebe ihr Vorkommen finden, wurde für B7-H1 auch ein Vorhandensein in nicht-lymphatischem Gewebe wie z.B. Plazenta und verschiedenen Tumoren, darunter Brust, Zervix, Lunge, Ovar und Kolon beschrieben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von B7-H1 in humanen Glioblastomen *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen und dessen funktionelle Bedeutung für eine Tumor-Immunzellinteraktion darzustellen.

Zwölf Gliomzelllinien wurden auf das Vorkommen von B7-H1 mRNA Transkripten getestet. Alle Zelllinien wiesen konstitutionell eine niedrige Rate von B7-H1 mRNA Transkripten auf, die in Gegenwart von IFN- γ signifikant gesteigert werden konnte. Der Nachweis der Zelloberflächenexpression gelang mit einem spezifischen Antikörper, Klon 5H1, mittels Durchflusszytometrie-Analyse. Hiermit konnten die Ergebnisse der mRNA-Daten bestätigt werden: B7-H1 Protein war bei allen 12 Gliomzelllinien nachzuweisen, in Gegenwart von IFN- γ zeigte sich eine Hochregulation. Zur Darstellung des Vorkommens von B7-H1 in Glioblastomen *in vivo* wurden 10 unterschiedliche histologische Präparate immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper 5H1 angefärbt und ausgewertet. Über 50% der Tumorzellen wiesen B7-H1 auf ihrer Zelloberfläche auf, während das umgebende normale Hirngewebe negativ für B7-H1 war.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von B7-H1 für die Glioblastom-Immunzellinteraktion wurden alloreaktive Kokulturversuche durchgeführt. Dafür wurden aufgereinigte CD4⁺ oder CD8⁺ alloreaktive T-Zellen mit Zellen der Gliomzelllinie LN229 über 48h mit oder ohne Antikörper, der das B7-H1 Protein auf der Zelloberfläche von LN229 blockiert, inkubiert. Die Überstände wurden

auf IFN- γ und IL-2 mittels ELISA sowie T-Lymphozyten auf die Aktivitätsmarker CD69 und ICOS getestet.

Die Neutralisierung von B7-H1 führte zu einer signifikanten Vermehrung von sowohl IFN- γ als auch IL-2 Produktion der CD4+ T-Zellen. Gleiches Verhalten zeigten CD8+ T-Zellen, wobei dort die Zytokinproduktion weniger ausgeprägt anstieg. Parallel zu den Ergebnissen der Zytokinproduktion zeigte vor allem der Aktivitätsmarker CD69 nach Neutralisierung von B7-H1 ein vermehrtes Auftreten auf der Zelloberfläche von CD4+ T-Zellen. Gleiche Ergebnisse zeigten CD8+ T-Zellen. ICOS, ebenfalls ein Aktivitätsmarker für T-Zellen, zeigte keine Änderung in seinem Auftreten auf der Zelloberfläche von T-Zellen nach 48h Inkubation mit LN229 mit blockiertem oder vorhandenem B7-H1 Protein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von B7-H1 in Gliomzelllinien einen hemmenden Effekt auf die Immunantwort von CD4+ und CD8+ T-Zellen hat. Da Glioblastome beispielhaft sind in ihrer Fähigkeit, sowohl durch lösliche als auch durch membranständige Faktoren eine effektive Immunantwort zu unterbinden, stellt B7-H1 damit einen neu charakterisierten Mechanismus dar, mit dem sich Glioblastome einer Kontrolle durch das Immunsystem entziehen können (Immunevasionsmechanismus).

Diese Ergebnisse wurden 2005 durch die Arbeit einer anderen Gruppe in ganz ähnlicher Weise bestätigt [32].

Dieser vermutete Mechanismus wird auch durch Beobachtungen gestützt, die in klinischen Nachbeobachtungsstudien von Patienten mit z.B. Nierenzellkarzinom oder duktalem Mammakarzinom eine Korrelation zwischen B7-H1 Expression der jeweiligen Tumoren und der Langzeitprognose zeigten [33][34].

In der Tumor-Immuntherapie gibt es viele Ansätze, wobei die Immunisierung mit tumorassoziierten Antigenen oder die Übertragung von tumorspezifischen T-Zellen im Zusammenhang mit dem so genannten 'Tumor Microenvironment', wozu B7-H1 gezählt wird, viel versprechend erscheinen. Berichte hierzu gibt es z.B. zum malignen Melanom. Dort existieren bereits Patientendaten, die gezeigt haben, dass eine Immunisierung mit Tumorstoffen die Anzahl an tumorspezifischen T-Zellen erhöht, sich jedoch keine effektive Immunantwort,

erkennbar durch eine Tumorkontrolle, einstellt [35][36]. Ähnlich sieht es mit der Übertragung von tumorspezifischen T-Zellen aus. Es konnte gezeigt werden, dass sie sich auch wirklich in Tumorgewebe, Metastasen oder Tumordrainierenden Lymphknoten wiederfinden, aber auch hier ohne eine ausreichende Tumorkontrolle zu initiieren [37]. Diese Effekte wären durch das Vorhandensein von B7-H1 erklärbar und könnten beispielsweise durch Antikörperblockade eine Möglichkeit bieten, die antitumorale Immunantwort zu stärken [38].

Zusammenfassend ergibt sich somit die Möglichkeit einer immuntherapeutischen Strategie für B7-H1 exprimierende Tumoren: Die Interferenz mit dem inhibitorischen B7-H1 Signalweg könnte eine Erleichterung antitumoraler Immunantworten bedeuten und damit die körpereigene Immunantwort stärken sowie andere immuntherapeutische Ansätze unterstützen.

3.2 Expression und Relevanz von B7-H3 im humanen Muskel:

Implikation für muskuläre Immunantworten

B7-H3 ist wie B7-H1 ein neu entdecktes Mitglied der B7 Familie von Kostimulationsmolekülen. Ebenso wie B7-H1 findet sich eine relativ breite, nicht auf lymphatisches Gewebe restringierte Gewebeexpression. Der Muskel ist Ort vieler erwünschter, z.B. bei der Immunisierung, als auch unerwünschter Immunreaktionen, z.B. Autoimmunerkrankungen. Ziel dieser Arbeit sollte die Untersuchung von B7-H3 und dessen immunregulatorischen Fähigkeiten im Muskel sein.

Zunächst wurde mittels Western Blot Analyse gezeigt, dass B7-H3 Protein in zwei von zwei getesteten human Myoblasten, 99/02 und 30/02, und der Rhabdomyosarkomzelllinie TE671, die phänotypische Charakteristika von Muskelzellen zeigt, vorkommt. Weiterhin wurden durchflusszytometrische Analysen der genannten Zellen durchgeführt. Sie zeigen, dass B7-H3 auf der Zelloberfläche von Muskelzellen vorkommt.

Die funktionelle Rolle von B7-H3 wurde mit Hilfe von Kokulturversuchen an siRNA Transfektanten für B7-H3 durchgeführt. Spezifischen CD8+ T-Zellen, die zuvor in Anwesenheit der kompletten Blutlymphozyten mit TE671 Wildtyp-Zellen stimuliert worden waren, wurden auf ihre zytotoxische Aktivität getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die wenig B7-H3 auf ihrer Zelloberfläche haben, besser von CD8+ T-Zellen lysiert werden. Es scheint also so, dass B7-H3 eine inhibitorische Wirkung auf die zytotoxische Aktivität von CD8+ Effektor-T-Zellen hat.

B7-H3 wurde hiermit als ein neues hemmendes kostimulatorisches Molekül neben B7-H1 und ICOS-L für die Muskel-Immunzellinteraktion identifiziert. Es werden aber weitere Untersuchungen (z.B. mit B7-H3 knock-out Mäusen) nötig sein, um zu klären, inwieweit B7-H3 eine immunmodulatorische Therapieoption z.B. bei Autoimmunerkrankungen wie der Polymyositis darstellen oder welchen Einfluss es auf die Gentherapie hereditärer Muskelerkrankungen wie z.B. der Muskeldystrophie Duchenne haben könnte

4. Abkürzungsverzeichnis

B7-H1	B 7 Homologue 1 (= PD-L1) ; CD274
B7-H3	B 7 Homologue 3 ; CD 276
B7RP-2	B 7 Related Protein - 2
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated Antigen 4
E:T	Effector:Target
HLA-G	Human Leukocyte Antigen - G
ICOS	Inducible COStimulator
ICOS-L	Inducible COStimulator - Ligand
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger RNA
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	Programmed Death – 1 Receptor
PD-L1	Programmed Death – Ligand 1
SFI	Specific Fluorescence Index
siRNA	short interfering RNA
TNF	Tumor Necrosis Factor

5. Literaturverzeichnis

- [1] Chambers C. 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22(4):217-23.
- [2] Greenwald R, Freeman G, Sharpe A. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-48.
- [3] Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5(12):1365-69.
- [4] Freeman G, Long A, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz L, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne M, Horton H, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman M, Carreno B, Collins M, Wood C, Honjo T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192(7):1027-34.
- [5] Dong H, Strome S, Salomao D, Tamura H, Hirano F, Flies D, Roche P, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon V, Celis E, Chen L. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8(8):793-800.
- [6] Carter L, Fouser L, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood C, Collins M, Honjo T, Freeman G, Carreno B. 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32(3):634-43.
- [7] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(19):12293-97.
- [8] Strome S, Dong H, Tamura H, Voss S, Flies D, Tamada K, Salomao D, Chevillie J, Hirano F, Lin W, Kasperbauer J, Ballman K, Chen L. 2003. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63(19):6501-5.
- [9] Blank C, Brown I, Peterson A, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, Gajewski T. 2004. PD-L1/B7-H1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res* 64(19):1140-45.
- [10] Walker P, Calzascia T, Dietriche P. 2002. All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumors. *Immunology* 107: 28-38.
- [11] Wiendl H, Mitsdoerffer M, Weller M. 2003. Hide-and-see in the brain: a role for HLA-G mediating immune privilege for glioma cells. *Semin Cancer Biol.* 13(5): 343-51.
- [12] Chapoval A, Ni J, Lau J, Wilcox R, Flies D, Liu D, Dong H, Sica G, Zhu G, Tamada K, Chen L. 2001. B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nat Immunol.* 2(3):269-74.
- [13] Sun M, Richards S, Prasad D, Mai X, Rudensky A, Dong C. 2002. Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J Immunol.* 168(12):6294-97.

- [14] Steinberger P, Majdic O, Derdak S, Pfisterhammer K, Kirchberger S, Klauser C, Zlabinger G, Pickl W, Stöckl J, Knapp W. 2004. Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J Immunol.* 172(4):2352-59.
- [15] Ling V, Wu P, Spaulding V, Kieleczawa J, Luxenberg D, Carreno B, Collins M. 2003. Duplications of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics* 82(3):365-77.
- [16] Sun X, Vale M, Leung E, Kanwar J, Gupta R, Krissansen G. 2003. Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene Ther.* 10(20):1728-34.
- [17] Luo L, Chapoval A, Flies D, Zhu G, Hirano F, Wang S, Lau J, Dong H, Tamada K, Flies A, Liu Y, Chen L. 2004. B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells. *J Immunol.* 173(9):5445-50.
- [18] Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa A, Negri F, Conte R, Corrias M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. 2004. Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(34):12640-45.
- [19] Suh W, Gajewska B, Okada H, Gronski M, Bertram E, Dawicki W, Duncan G, Bukczynski J, Plyte S, Elia A, Wakeham A, Itie A, Chung S, Da Costa J, Arya S, Horan T, Campell P, Gaida K, Ohashi P, Watts T, Yoshinaga S, Bray M, Jordana M, Mak T. 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol.* 4(9):899-906.
- [20] Goebels N, Michaelis D, Wekerle H, Hohlfeld R. 1992. Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J Immunol* 149(2):661-7.
- [21] Smythe G, Hodgetts S, Grounds M. 2000. Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol Ther* 1(4):304-13.
- [22] Mendell J, Kissel J, Amato A, King W, Signore L, Prior T, Sahenk Z, Benson S, McAndrew P, Rice R. 1995. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 333(13):832-8.
- [23] Blau H, Springer M. 1995. Muscle-mediated gene therapy. *N Engl J Med* 333(23):1554-6.
- [24] Schmidt J, Rakocevic G, Raju R, Dalakas M. 2004. Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain* 127:1182-90.
- [25] Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, 2003. Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOS-L: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain.* 126:1026-35.
- [26] Wiendl H, Behrens L, Maier S, 2000. Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G. *Ann Neurol* 48:679-84.
- [27] Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, 2003. The nonclassical MHC-molecule HLA-G protects muscle cells from immune mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain.* 126:176-185.

- [28] Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, 2003. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J.* 17:1892-94.
- [29] Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier BC, 2005. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol.* 26(7): 373-80.
- [30] Brummelkamp T, Bernards R, Agami R, 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-3.
- [31] Morgenstern J, Land H, 1990. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of their reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 18:1068.
- [32] Wilmotte R, Burkhardt K, Kindler V, Belkouch MC, Dussex G, Tribolet de N, Walker P, Dietrich PY, 2005. B7-homolog 1 expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion. *NeuroReport* 16:1081-85.
- [33] Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Chevillat JC, Kwon ED, 2006. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* 66: 3381-3385.
- [34] Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigen T, Dermime S, 2006. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* 8: 190-198.
- [35] Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spleess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE, 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 4: 321-327.
- [36] Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, Royal RE, Kammula U, Restifo NP, Hughes MS, Schwartzentruber D, Berman DM, Schwarz SL, Ngo LT, Mavroukakis SA, White DE, Steinberg SM, 2005. Tumor Progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol.* 175: 6169-6176.
- [37] Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R, 2006. Phase I study of adoptive T-cell Therapy with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24: 5060-5069.
- [38] Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, Lau JS, Zhu G, Tamada K, Dhen L, 2005. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65: 1089-1096.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich nun all denjenigen meinen Dank einmal in schriftlicher Form aussprechen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und mir gezeigt haben, wie wissenschaftliches Arbeiten in einem freundlichen und offenen Team funktioniert, sodass mein weiteres Interesse daran geweckt wurde.

Insbesondere danken möchte ich

- Prof. Dr. Heinz Wiendl, der diese Arbeit betreut hat. Sein eigenes großes Interesse für Wissenschaft brachte viele Ideen für Projekte hervor, seine Offenheit war Grundlage von konstruktiven Diskussionen über den Werdegang von Projekten und ermöglichte somit auch die Einbringung und Umsetzung von eigenen Vorschlägen.
- Meike Mitsdörffer, durch deren Hilfe ich am Anfang das 'Laufen' im Labor lernte. Vieles über Zellkultur, Blutlymphozyten und natürlich das 'FACSen' habe ich von ihr gelernt.
- Simone Pöschel, die gute Seele des Labors. Einen guten Ratschlag bei technischen Problemen hatte sie fast immer, aber auch sonst ein offenes Ohr für alle möglichen Dinge ...
- Jörg Wischhusen, von 'den Wellers', der allzeit ansprechbar und hilfsbereit war, immer einen guten Rat oder weiterführende Ideen parat hatte, auch wenn er mit seinen vielen eigenen Projekten beschäftigt war. Dank ihm habe ich auch noch in die Molekularbiologie reingeschnuppert, gestaunt über das 'Blasten' von Gendatenbanken, das Klonieren und Sequenzieren, aber am Ende waren die Zellen dann wirklich transfiziert!
- Melanie Kraft, die mir das eine oder andere vor allem zur Prüfungszeit und während des PJs abgenommen hat.

Und natürlich auch ganz herzlichen Dank an Prof. Dr. Melms, Eva Tolosa, Bettina Schreiner, Dagmar Schneider, Petra Schroth, die AG Weissert und alle, die jetzt nicht namentlich genannt wurden.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern und Geschwistern danken, die mich immer unterstützt und Verständnis für meine Zeitknappheit und meine seltenen Besuche aufgebracht haben.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Wintterle
Geboren: 17.05.1979 in Stuttgart

Ausbildung

Schule

1985-1998 Besuch der Mühlbachhof-Grundschule und des Königin-Katharina-Stift Gymnasiums in Stuttgart
Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 2000 Ärztliche Vorprüfung
August 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2004 Pädiatrie (PJ), Olgahospital Stuttgart
Februar 2005 Chirurgie (PJ), Diakonie-Klinikum Stuttgart
Juni 2005 Innere Medizin (PJ), Diakonie-Klinikum Stuttgart
30.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02.12.2006 Approbation als Ärztin

Jan./Feb. 2006 Hospitation in der Abteilung für Anästhesie, Diakonie-Klinikum Stuttgart
Mai 2006 Beginn als Assistenzärztin am Uniklinikum Göttingen, Innere Medizin, Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie

Publikationen

Helmut Rainer Salih, **Sabine Wintterle**, Matthias Krusch, Antje Kroner, Yu-Hwa Huang, Lieping Chen, Heinz Wiendl. 2006. The role of Leukemia derived B7-H1 (PD-L1) in Tumor-T-Cell interactions in humans. *Exp Hematol.* 34: 888-894.

Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, Weller M, Wiendl H. 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 63 (21): 7462-7.

Wiendl H, Neuhaus O, Mehling M, **Wintterle S**, Schreiner B, Mitsdoerffer M, Wienhold W, Weissert R, Wessels J, Hartung HP, Weller M, Tolosa E, Melms A. 2003. The CD28 related molecule ICOS: T cell modulation in the presence and absence of B7.1/2 and regulational expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 140 (1-2):177-87.