

## Paper of the Quarter – QIII/2023 – [GAIN](#)

### Functional Relevance of CTLA4 Variants: an Upgraded Approach to Assess CTLA4-Dependent Transendocytosis by Flow Cytometry

J Clin Immunol. 2023 Sep 23. [->PubMed-Link<<](#)

Jessica Rojas-Restrepo, Elena Sindram, Simon Zenke, Hanna Haberstroh, Noriko Mitsui, Annemarie Gabrysch, Katrin Huebscher, Sara Posadas-Cantera, Máté Krausz, Robin Kobbe, Jan C Rohr, Bodo Grimbacher, Laura Gámez-Díaz

---

CTLA4 ist ein negativer Immunregulator, der konstitutiv in regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Seine extrazelluläre Funktion besteht darin, die Aktivierung von T-Zellen zu hemmen, indem es CD28 beim Binden an ihre gemeinsamen Liganden CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen auskonkurriert. Nach der Bindung entfernt CTLA4 seine Liganden und internalisiert sie durch einen Prozess namens Transendocytose. Varianten von unklarer Signifikanz (VUS) in CTLA4 werden häufig bei Patienten mit Antikörpermangel oder Immundysregulation, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Patienten mit Autoimmunität und Inflammation in mehreren Organen, festgestellt. Um die Diagnose einer CTLA4-Insuffizienz zu stellen, muss die Funktionalität jeder einzelnen CTLA4-Variante bestimmt werden. Zur Beurteilung von CTLA4-VUS wurden verschiedene Methoden beschrieben, wie die Analyse der CTLA4-Expression, der Treg-Suppression und der CD80/CD86-Transendocytose. Der Transendocytose Assay, erstmals 2009 beschrieben, untersucht die Internalisierung von CD80/CD86 durch regulatorische T-Zellen unter Verwendung einer synthetischen antigenpräsentierenden Zelle. CD4+ T-Zellen von Patienten werden mit Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen kultiviert, die CD80/CD86 an GFP gekoppelt exprimieren. Herausforderungen dieses Tests sind jedoch die schwache Fluoreszenzintensität des internalisierten Liganden (CD80/CD86), die unzureichende Reproduzierbarkeit und die suboptimale Funktionalität bei der Verwendung von aufgetauten Zellen. In dieser Studie verglichen wir die CD80-GFP CHO-Zelllinie mit einer neu konstruierten CD80-mScarlet-exprimierenden CHO-Zelllinie und beobachteten eine geringere Variabilität zwischen den jeweiligen Experimenten sowie die Möglichkeit den Assay unabhängig vom Ausgangsmaterial (frische oder aufgetaute periphere mononukleäre Zellen) erfolgreich durchzuführen, wenn CD80-mScarlet CHO-Zellen verwendet wurden. Zusätzlich zeigte eine Receiver-Operating-Charakteristik-Analyse eine 100%ige Spezifität, die eine klare Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht pathogenen CTLA4-Varianten ermöglicht. Insgesamt untersuchten wir die Pathogenität von 24 CTLA4-Varianten und stellten bei 17 Varianten eine verminderte CTLA4 Funktion fest, während sieben normal getestet wurden. Hiermit bieten wir einen verbesserten Ansatz zur Bewertung der CD80-Transendocytose mittels Durchflusszytometrie zur Beurteilung der Funktionalität von CTLA4-Varianten.

---

**Autor:in:** Elena Sindram

**Kontakt:** elena.sindram@uniklinik-freiburg.de

## Paper of the Quarter – QIII/2023 – [GAIN](#)

### Functional Relevance of CTLA4 Variants: an Upgraded Approach to Assess CTLA4-Dependent Transendocytosis by Flow Cytometry

J Clin Immunol. 2023 Sep 23. [>>PubMed-Link<<](#)

Jessica Rojas-Restrepo, Elena Sindram, Simon Zenke, Hanna Haberstroh, Noriko Mitsuiki, Annemarie Gabrysch, Katrin Huebscher, Sara Posadas-Cantera, Máté Krausz, Robin Kobbe, Jan C Rohr, Bodo Grimbacher, Laura Gámez-Díaz

---

CTLA4 is a negative immune regulator constitutively expressed in regulatory T cells. Its extracellular activity consists of inhibiting T-cell activation by outcompeting CD28 for binding to their shared costimulatory ligands CD80 and CD86 expressed on antigen-presenting cells (APCs). Following binding, CTLA4 removes its ligands and internalizes them through a process called transendocytosis. Variants of uncertain significance (VUS) in *CTLA4* are frequently identified in patients with antibody deficiency or immune dysregulation syndromes including, but not limited to those with multi-organ autoimmunity and autoinflammation. To ascertain the diagnosis of CTLA4 insufficiency, the functionality of each *CTLA4* variant needs to be determined. Several methods, such as analyzing CTLA4 expression, Treg suppression and CD80/CD86 transendocytosis, have been described for assessing *CTLA4* VUS. The transendocytosis assay, first described in 2009, involves evaluating CD80/CD86 internalization by regulatory T cells using an artificial APC. Patients CD4+ T cells are co-cultured with Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing CD80/CD86 coupled to GFP. However, challenges of this assay include weak fluorescence intensity of the internalized ligand, poor reproducibility and suboptimal performance with thawed cells. In this study, we compared the CD80-GFP CHO cell line with a novel CD80-mScarlet expressing CHO cell line and observed lower inter-assay variability and improved robustness of the assay, regardless of the starting material (fresh or thawed peripheral mononuclear cells), when using CD80-mScarlet CHO cells. Moreover, receiver operating characteristic analysis showed 100% specificity, allowing for a clear distinction between pathogenic and non-pathogenic *CTLA4* variants. In total, we assessed the pathogenicity of 24 *CTLA4* variants and observed reduced transendocytosis for 17 variants, while seven tested normal. Overall, we provide an upgraded approach to assess CD80 transendocytosis by flow cytometry for evaluating the functionality of *CTLA4* variants.

---

**Author:** Elena Sindram

**Contact:** elena.sindram@uniklinik-freiburg.de