

**Die Relevanz des induzierbaren Kostimulators ICOS
für die Differenzierung und Aufrechterhaltung
der folliculären T-Helferzellen *in vivo***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

DIPL.-BIOCHEM. RANDI KRISTINA FRANKE

aus Berlin

September 2012

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01. August 2008 bis 30. Juni 2012 unter der Leitung von Dr. Andreas Hutloff in der Arbeitsgruppe Chronische Immunreaktionen am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum und in der Projektgruppe Molekulare Immunologie am Robert Koch-Institut angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Andreas Hutloff
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 06. Dezember 2012

Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Andreas Hutloff für das spannende Projekt meiner Dissertation und die exzellente fachliche Betreuung während meiner Doktorandenzeit danken. Die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen hatten einen großen Anteil daran, dass mir die Laborarbeit so viel Spaß bereitet hat. Durch die zahlreichen und vor allem hilfreichen Diskussionen konnte ich meine wissenschaftlichen Kenntnisse erweitern. Außerdem danke ich ihm für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Richard A. Kroczeck danke ich für die Bereitstellung der Labor- und Büroräume am Robert Koch-Institut, in denen unsere unabhängige DRFZ-Gruppe forschen durfte und in denen die meisten Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden. Zudem waren die Diskussionen in den Seminaren für das Voranschreiten meiner Arbeit und meine wissenschaftliche Entwicklung sehr hilfreich.

Meinen Dank möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel aussprechen, der sich als Gutachter für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Unterstützung bei den Microarray-Analysen erhielt ich freundlicherweise von Joachim Grün, der mir bei der Auswertung der Daten behilflich war, sowie von Heidi Schliemann, die die Microarrays letztendlich durchgeführt hat (beide Deutsches Rheuma-Forschungszentrum). Vielen Dank.

Viele Experimente konnten erst durch die zahlreichen helfenden Hände der AG Hutloff und der AG Kroczeck verwirklicht werden. Dafür möchte ich mich bei allen derzeitigen und früheren Arbeitsgruppenmitgliedern sowie den Tierpflegern am RKI erkenntlich zeigen. Danke liebe RAK-ker! Insbesondere gilt mein Dank Dr. Yvonne Burmeister für die großartige Einarbeitung zu Beginn meiner Arbeit. Mit Dana Vu Van habe ich viele gemeinsame Stunden im Tierstall verbracht und immer sehr gerne die Ergebnisse unserer aktuellen Experimente diskutiert – wie erfreulich oder enttäuschend diese auch immer waren.

Für die Durchsicht dieser Arbeit und die zahlreichen Anregungen danke ich Dr. Katharina Funk, Dr. Katharina Steinberg, Franziska Jakob und Boris Feist. Ich hoffe, Ihr habt Eure immunologischen Fachkenntnisse vertieft, neu gegründet oder lange geschlossene und verstaubte Schubladen im Gehirn wieder geöffnet.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei all meinen Freunden bedanken, die mir während meiner Promotionszeit Mut zugesprochen haben sowie mich unterstützt und motiviert haben, wo und wie es nur ging. Besonders in schwierigen Zeiten konnte ich immer auf Euch zählen, und Ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich. Dies bezieht sich auch auf die Promotionszeit vor dieser Promotion.

Für die vielen unterstützenden und aufbauenden Worte besonders gegen Ende meiner Promotion danke ich meiner Schwester Astrid, meiner Mutter sowie meinem Freund Boris. Ohne Euren Zuspruch wäre diese Arbeit jetzt nicht fertig.

Randi

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	v
TABELLENVERZEICHNIS	vii
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 SUMMARY	2
3 EINLEITUNG	3
3.1 Die adaptive Immunantwort	3
3.2 T-Zellkostimulation	3
3.2.1 ICOS und ICOS-L	5
3.2.2 Signaltransduktion über ICOS und CD28	7
3.3 Follikuläre T-Helferzellen	8
3.3.1 Definition und Subtypen von T _{FH} -Zellen	8
3.3.2 Differenzierung von T _{FH} -Zellen	9
3.4 Keimzentrums-Reaktion und Bildung von B-Zell-Gedächtnis.....	11
3.5 Zielsetzung.....	14
4 MATERIAL UND METHODEN.....	15
4.1 Material.....	15
4.1.1 Standardlösungen	15
4.1.2 Verwendete Antikörper und Fluorophore.....	15
4.2 Mäuse	17
4.3 Zellbiologische Methoden.....	18
4.3.1 Isolierung von murinen Zellen	18
4.3.2 <i>In vitro</i> -Restimulation von Zellen	18
4.3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)	18
4.3.4 CFSE-Markierung von Zellen	19
4.4 Tierexperimentelle Methoden.....	19
4.4.1 Adoptiver Transfer von Zellen	19
4.4.2 Immunisierung von Tieren	20

4.4.3	<i>In vivo</i> -Blockaden mit Antikörpern.....	20
4.5	Durchflusszytometrie.....	20
4.5.1	Oberflächenfärbung.....	20
4.5.2	Intrazelluläre Färbung	21
4.5.3	Nachweis von Apoptose	21
4.5.4	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	22
4.6	Molekularbiologische Methoden	23
4.6.1	Präparation von Gesamt-RNA aus primären Zellen.....	23
4.6.2	Microarray-Analyse.....	23
4.6.3	Reverse Transkription	24
4.6.4	Quantitative <i>realtime</i> -RT-PCR.....	24
4.7	Histologische Methoden.....	26
4.7.1	Einfrieren von Gewebe und Anfertigung von Kryoschnitten.....	26
4.7.2	Immunfluoreszenz	26
4.8	Statistische Analysen	27
5	ERGEBNISSE	28
5.1	Das adoptive Transfersystem.....	28
5.1.1	Das adoptive T-/B-Kooperationssystem.....	28
5.1.2	Bisherige Ergebnisse aus dem T-Zelltransfersystem und dem T-/B-Kooperationssystem	30
5.2	Optimierung des T-/B-Kooperationssystems und Vergleich mit dem T-Zelltransfersystem.....	30
5.2.1	Höhere Proliferation und bessere Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen bei adoptivem Transfer von geringeren Zellzahlen.....	30
5.2.2	Beschleunigte Expansions- und Aktivierungskinetik der transgenen B-Zellen bei Kotransfer von transgenen T-Zellen.....	32
5.2.3	Expansions- und Aktivierungskinetik im optimierten adoptiven T-/B-Kooperationssystem	35
5.2.4	Erhöhter Anteil an T _{FH} -Zellen bei Transfer einer geringeren Anzahl an transgenen T-Zellen und bei Kotransfer von transgenen B-Zellen.....	36
5.3	Fehlende ICOS-Kostimulation: Effekte auf Antigen-spezifische T-Zellen zu frühen Zeitpunkten	38
5.3.1	Transkriptom-Analyse von transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation	38

5.3.2	Validierung der Genexpression von einigen ausgewählten Genen über <i>realtime</i> -RT-PCR	42
5.3.3	Die initiale T _{FH} -Zelldifferenzierung scheint unabhängig von ICOS zu sein	44
5.3.4	Migration der transgenen T-Zellen in die B-Zellfollikel wird durch fehlende ICOS-Kostimulation nicht beeinträchtigt	45
5.4	T-Zell-intrinsische und T-Zell-extrinsische Effekte der fehlenden ICOS-Kostimulation.	46
5.4.1	ICOS-Expression auf Antigen-spezifischen T _{FH} ⁻ und nicht-T _{FH} -Zellen	47
5.4.2	In Abwesenheit von ICOS-Kostimulation werden weniger T _{FH} -Zellen, GC T _{FH} -Zellen und GC B-Zellen gebildet	48
5.4.3	Die verminderte T _{FH} -Zelldifferenzierung in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation ist ein T-Zell-intrinsischer Effekt.....	49
5.4.4	Erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 (IL-2R α) in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation: ein T-Zell-intrinsischer und -extrinsischer Effekt	52
5.5	Blockade von ICOS-Signalen zu späten Zeitpunkten: Effekte auf Antigen-spezifische T_{FH}-Zellen und die Keimzentrums-Reaktion	53
5.5.1	Experimenteller Ablauf der späten ICOS-L Blockaden	53
5.5.2	T _{FH} -Zellen sind 48 h nach später ICOS-L Blockade phänotypisch fast nicht mehr detektierbar	55
5.5.3	Gesamtzellzahl der transgenen T-Zellen bleibt konstant nach später ICOS-L Blockade.	55
5.5.4	Späte Blockade der ICOS-Kostimulation führt nicht zu erhöhter Apoptose.....	56
5.5.5	Transgene T _{FH} -Zellen sind auch anhand weiterer T _{FH} -Zell-spezifischer Marker nach später ICOS-L Blockade nicht mehr nachweisbar	58
5.5.6	Nach Blockade des ICOS-Signalweges revertieren die transgenen T _{FH} -Zellen zu nicht-T _{FH} -Zellen.....	60
5.5.7	Erhöhte ICOS-Expression auf Antigen-spezifischen T _{FH} -Zellen nach Blockade der ICOS-Kostimulation	62
5.5.8	IL-21-Produktion der transgenen T _{FH} -Zellen ist nach Blockade der ICOS-Signale reduziert.....	62
5.5.9	Verminderte Frequenz an Antigen-spezifischen B-Zellen und GC B-Zellen nach später Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion.....	64
5.5.10	Sortierung transgener T _{FH} ⁻ und nicht-T _{FH} -Zellen 6 h nach später ICOS-L Blockade	66
5.5.11	Transkriptom-Analyse der transgenen T _{FH} -Zellen 6 h nach Blockade der ICOS-Kostimulation	67
5.5.12	Validierung der Genexpression einiger ausgewählter Gene in transgenen T _{FH} ⁻ und nicht-T _{FH} -Zellen über <i>realtime</i> -RT-PCR	73

5.5.13	ICOS-Kostimulation spielt in transgenen T-Zellen zu frühen und in transgenen T_{FH} -Zellen zu späten Phasen der Immunreaktion eine unterschiedliche Rolle.....	76
6	DISKUSSION.....	78
6.1	Optimierung des adoptiven T-/B-Kooperationssystems.....	78
6.2	ICOS-Signale haben keinen entscheidenden Einfluss auf die frühe T_{FH} -Zelldifferenzierung.....	80
6.3	ICOS-Kostimulation ist für die Existenz von T_{FH} -Zellen, GC T_{FH} -Zellen und GC B-Zellen notwendig.....	84
6.4	Differenzierung zwischen T-Zell-intrinsischen und T-Zell-extrinsischen Effekten der fehlenden ICOS-Kostimulation.....	85
6.5	Kontinuierliche Signale über ICOS sind für die Aufrechterhaltung von differenzierten T_{FH} -Zellen notwendig.....	86
6.6	Mögliche Mechanismen der durch ICOS vermittelten Aufrechterhaltung des T_{FH} -Zellphänotyps und Vergleich mit der Rolle von ICOS zu frühen Zeitpunkten.....	91
6.7	Schlussfolgerung.....	95
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	96
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	106
9	PUBLIKATIONEN.....	109
10	LEBENS LAUF.....	111

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Kostimulatorische Moleküle.	4
Abb. 2:	Interaktion von T _{FH} -Zellen und B-Zellen.	9
Abb. 3:	Bildung von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen in Keimzentrums-Reaktion und extrafollikulärer Reaktion.	12
Abb. 4:	<i>Gating</i> -Strategie für durchflusszytometrische Daten.	21
Abb. 5:	<i>Gating</i> -Strategie für apoptotische Zellen.	22
Abb. 6:	Das adoptive T-/B-Kooperationssystem.	28
Abb. 7:	WT und ICOS KO bzw. ICOS-L KO Gruppe im adoptiven Transfersystem.	29
Abb. 8:	Expansion und Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen.	32
Abb. 9:	Expansion und Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen bei Titration der transferierten T-Zellzahl.	34
Abb. 10:	Expansion der transgenen T- und B-Zellen und Bildung von transgenen GC B-Zellen.	36
Abb. 11:	Generierung von T _{FH} -Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten OT-II T-Zellen und vom B1-8i B-Zellkotransfer.	37
Abb. 12:	Transkriptom-Analyse von transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung.	39
Abb. 13:	Validierung der Genexpression in transgenen T-Zellen mittels <i>realtime</i> -RT-PCR.	43
Abb. 14:	Expression von BCL-6, CXCR5 und PD-1 in transgenen T-Zellen an Tag 3.	45
Abb. 15:	Lokalisation von transgenen T- und B-Zellen in ingLN an Tag 4.	46
Abb. 16:	ICOS-Expression auf transgenen und endogenen T _{FH} ⁺ und nicht-T _{FH} ⁺ -Zellen.	47
Abb. 17:	Verminderte Anzahl an T _{FH} ⁺ -Zellen, GC T _{FH} ⁺ -Zellen und GC B-Zellen in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation.	49
Abb. 18:	Erweitertes T-/B-Kooperationssystem mit simultanem Transfer von transgenen WT und ICOS KO T-Zellen.	50
Abb. 19:	T-Zell-intrinsische Effekte auf die T _{FH} ⁺ -Zelldifferenzierung bei fehlender ICOS- Kostimulation.	52
Abb. 20:	Anteil der CD25 ⁺ Zellen in transgenen WT und ICOS KO T-Zellen im erweiterten T-/B-Kooperationssystem.	53
Abb. 21:	Zeitlicher Ablauf und Mechanismus der späten ICOS-L Blockade.	54
Abb. 22:	Frequenz und absolute Zellzahl der transgenen T _{FH} ⁺ -Zellen nach später ICOS-L Blockade.	55
Abb. 23:	Frequenz und absolute Zellzahl des gesamten transgenen T-Zellpools zwei Tage nach später ICOS-L Blockade.	56
Abb. 24:	Messung der Apoptose in transgenen T _{FH} ⁺ und nicht-T _{FH} ⁺ -Zellen 24 h nach später ICOS-L Blockade.	57

Abb. 25: Transgene T _{FH} -Zellen sind über CXCR5, PD-1, CCR7 und BCL-6 nach später ICOS-L Blockade nicht mehr detektierbar.....	59
Abb. 26: Expression T _{FH} -Zell-spezifischer Marker nach später ICOS-L Blockade.....	61
Abb. 27: ICOS-Expression auf transgenen T _{FH} -Zellen nach später Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion.	62
Abb. 28: IL-21-Produktion von transgenen T _{FH} - und nicht-T _{FH} -Zellen nach später ICOS-L Blockade.	63
Abb. 29: Effekte der späten Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion auf die transgenen B-Zellen.	65
Abb. 30: Sortierungsstrategie für transgene T _{FH} - und nicht-T _{FH} -Zellen.....	67
Abb. 31: Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} - und nicht-T _{FH} -Zellen nach später ICOS-L Blockade.....	75
Abb. 32: Regulation der Genexpression bei fehlenden ICOS-Signalen in transgenen T-Zellen zu frühen und in transgenen T _{FH} - und nicht-T _{FH} -Zellen zu späten Zeitpunkten.	77

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	In der Durchflusszytometrie und magnetischen Zellsortierung verwendete Primärantikörper.....	16
Tab. 2:	In der Durchflusszytometrie verwendete Sekundärantikörper.....	17
Tab. 3:	In der Histologie verwendete Antikörper.....	17
Tab. 4:	Verwendete <i>TaqMan</i> [®] <i>Gene Expression Assays</i> (Applied Biosystems).....	25
Tab. 5:	Primer- und Sonden-Sequenz für <i>β2m</i> in der <i>TaqMan</i> [®] -PCR.....	26
Tab. 6:	Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: Gene mit bekannter Funktion für T _{FH} -Zellen.....	40
Tab. 7:	Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: Kostimulatoren.....	41
Tab. 8:	Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: Transkriptionsfaktoren.....	41
Tab. 9:	Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: sonstige Gene.....	42
Tab. 10:	Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade: Gene mit bekannter Funktion für T _{FH} -Zellen.....	69
Tab. 11:	Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade: Gene mit potentieller Funktion für T _{FH} -Zellen.....	69
Tab. 12:	Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade: Transkriptionsfaktoren.....	70
Tab. 13:	Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade: Zelldifferenzierungsmarker.....	70
Tab. 14:	Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade: Apoptose-zugehörige Gene (pro- und anti-apoptotisch).....	71
Tab. 15:	Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade: Gene mit bekannter Funktion für die Signaltransduktion (insbesondere PI3K-Signaltransduktion)..	72
Tab. 16:	Regulation der Genexpression in transgenen T _{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade: sonstige Gene.....	72

1 Zusammenfassung

Der induzierbare Kostimulator ICOS spielt eine wichtige Rolle in T-Zell-abhängigen Immunantworten. ICOS *knock-out* Mäuse weisen nach Immunisierung nur sehr kleine Keimzentren und reduzierte Immunglobulin-Spiegel auf. ICOS wird von aktivierten T-Zellen exprimiert, während sein einziger Ligand – ICOS-Ligand (ICOS-L) – hauptsächlich von Dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert wird. Follikuläre T-Helferzellen (T_{FH} -Zellen) sind für die Keimzentrums-Reaktion unentbehrlich, da sie den Antigen-spezifischen B-Zellen Hilfe leisten. Eine hohe Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 bei gleichzeitig niedriger Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ist für die Lokalisation der T_{FH} -Zellen in den B-Zellfollikeln entscheidend. Die Differenzierung der T_{FH} -Zellen ist vom Mastertranskriptionsfaktor BCL-6 abhängig. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht komplett aufgeklärt. ICOS hat offensichtlich eine große Bedeutung für T_{FH} -Zellen, da sich nur wenige T_{FH} -Zellen bei fehlender ICOS-Kostimulation ausbilden und ICOS in hohem Maße von T_{FH} -Zellen exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz von ICOS für die Differenzierung bzw. Aufrechterhaltung von T_{FH} -Zellen *in vivo* untersucht. Um Antigen-spezifische T- und B-Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren, wurde ein murines adoptives T-/B-Kooperationssystem verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass ICOS für die initiale T_{FH} -Zelldifferenzierung nicht erforderlich ist. Zu frühen Zeitpunkten (Tag 1 bis 4) konnten Antigen-spezifische T-Zellen bei fehlender ICOS-Kostimulation sowohl die Expression des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 induzieren als auch in die B-Zellfollikel einwandern. Zu späteren Zeitpunkten (Tag 7 bis 10) hingegen war die T_{FH} -Zellzahl drastisch reduziert, was auf einen T-Zell-intrinsischen Effekt zurückgeführt werden konnte. Die Relevanz von ICOS für bereits differenzierte T_{FH} -Zellen zu späten Zeitpunkten (Tag 6) wurde untersucht, indem die ICOS-Kostimulation durch Applikation eines blockierenden anti-ICOS-L-Antikörpers unterbrochen wurde. Ohne kontinuierliche Signale über ICOS konnten die T_{FH} -Zellen ihren Phänotyp nicht aufrechterhalten, wobei das Überleben nicht beeinträchtigt wurde. Eine verminderte BCL-6-, CXCR5-, PD-1- und IL-21-Expression sowie eine erhöhte CCR7-Expression führten zur Konvertierung der T_{FH} -Zellen in nicht- T_{FH} -Zellen. Durch den Verlust des T_{FH} -Zellphänotyps reduzierte sich zugleich die Anzahl der Antigen-spezifischen Keimzentrums-B-Zellen. Um den molekularen Mechanismus aufzuklären, der für die ICOS-vermittelte Aufrechterhaltung des T_{FH} -Zellphänotyps verantwortlich ist, wurden umfassende Transkriptom-Analysen mittels Microarray und *realtime*-RT-PCR durchgeführt. Eine Vielzahl von Genen mit unterschiedlichen Funktionen wurde 6 h nach später ICOS-L Blockade in den T_{FH} -Zellen differentiell reguliert. Zu den am stärksten regulierten Genen gehörten die Transkriptionsfaktoren BACH2 und KLF2, die in T_{FH} -Zellen schwächer als in nicht- T_{FH} -Zellen exprimiert wurden und nach Blockade der ICOS-Kostimulation hochreguliert wurden. Demnach ist die Kostimulation über ICOS offenbar eher für die Aufrechterhaltung als für die Differenzierung der T_{FH} -Zellen notwendig.

2 Summary

The inducible costimulator ICOS plays an important role for T cell-dependent immune responses. ICOS *knock-out* mice develop only very small germinal centers and exhibit reduced levels of immunoglobulin upon immunization. ICOS is expressed by activated T cells whereas its only ligand – ICOS-ligand (ICOS-L) – is mainly expressed by dendritic cells and B cells. T follicular helper cells (T_{FH} cells) are essential for the germinal center reaction as they provide help to antigen-specific B cells. High expression of the chemokine receptor CXCR5 and at the same time low expression of the chemokine receptor CCR7 are important for the localization of T_{FH} cells in the B cell follicles. The differentiation of T_{FH} cells depends on the master transcription factor BCL-6. However, the exact mechanisms are not fully understood yet. ICOS seems to be important for T_{FH} cells since only low numbers of T_{FH} cells are generated in the absence of ICOS costimulation and ICOS is expressed at high levels by T_{FH} cells.

In the present work the relevance of ICOS *in vivo* for the differentiation or maintenance of T_{FH} cells respectively was analyzed. In order to analyze antigen-specific T and B cells on a single cell level a murine adoptive T/B cooperation system was used. It was shown that ICOS was not required for initial T_{FH} cell differentiation. In particular, at early time points (day 1 to 4) antigen-specific T cells were able to induce expression of the master transcription factor BCL-6 as well as to migrate into B cell follicles in the absence of ICOS costimulation. In contrast, at late time points (day 7 to 10) T_{FH} cell numbers were severely reduced, which was revealed to be a T cell-intrinsic effect. The relevance of ICOS for already differentiated T_{FH} cells at late time points was analyzed by applying a blocking anti-ICOS-L antibody and thereby interrupting ICOS costimulation. Without continuous ICOS signals T_{FH} cells were not able to maintain their phenotype, whereas the survival of the T_{FH} cells was not affected. The reduced expression of BCL-6, CXCR5, PD-1 and IL-21 as well as the increased expression of CCR7 induced the conversion of T_{FH} cells into non-T_{FH} cells. The loss of the T_{FH} cell phenotype also resulted in reduced numbers of antigen-specific germinal center B cells. To delineate the molecular mechanisms crucial for the ICOS-mediated maintenance of the T_{FH} cell phenotype, extensive transcriptome analyses using microarrays and *realtime*-RT-PCR were performed. Numerous genes with various functions were differentially regulated in T_{FH} cells 6 h after late ICOS-L blockade. The most strongly regulated genes included the transcription factors BACH2 and KLF2 which showed lower expression in T_{FH} cells than non-T_{FH} cells and were upregulated after blocking ICOS costimulation.

In conclusion, ICOS is essential for the maintenance of the T_{FH} cell phenotype rather than for the differentiation of T_{FH} cells.

3 Einleitung

3.1 Die adaptive Immunantwort

Für eine effektive Immunantwort gegen eindringende Pathogene ist die Bildung von Antikörpern erforderlich. Diese werden von Antigen-spezifischen B-Zellen gebildet, die nach Aktivierung durch ein für sie spezifisches Antigen proliferieren und zu hochaffine Antikörper-sezierenden Plasmazellen differenzieren. Für einen langanhaltenden Schutz gegen wiederkehrende Pathogene ist zudem die Ausbildung von Gedächtnis-B-Zellen notwendig. Einige dieser Prozesse laufen im Keimzentrum (GC, *germinal center*) ab, andere außerhalb des Keimzentrums in der sogenannten extrafollikulären Reaktion. Voraussetzung für die Differenzierung von Antigen-spezifischen B-Zellen zu Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen ist der Kontakt mit T-Zellen, die für dasselbe Antigen spezifisch sind und zuvor von Dendritischen Zellen (DZ) aktiviert wurden. Die T-/B-Zellinteraktion findet über die Bindung des T-Zellrezeptors (TZR) an Peptid-MHCII (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse II, *major histocompatibility complex class II*)-Komplexe, die von B-Zellen präsentiert werden, statt. Interaktionen zwischen kostimulatorischen Molekülen – entweder Zell-assoziierte Moleküle oder sekretierte Moleküle – modifizieren die T-/B-Zellinteraktion (McHeyzer-Williams et al., 2012).

Während der Keimzentrums-Reaktion, in der Immunglobulin-Klassenwechsel und Affinitätsreifung erfolgen, benötigen die B-Zellen Hilfe von T-Helferzellen. In den vergangenen Jahren wurde hierbei die Bedeutung der sogenannten follikulären T-Helferzellen (T_{FH} -Zellen) erkannt. Diese wurden als separater Subtyp der T-Helferzellen anerkannt und regulieren die B-Zell-Immunantwort, indem sie die notwendigen Signale an die B-Zellen liefern (Crotty, 2011; Fazilleau et al., 2009a).

3.2 T-Zellkostimulation

Die vollständige Aktivierung von T-Zellen in einer Immunantwort benötigt neben dem Signal über den TZR, der an spezifische Peptid-MHCII-Komplexe auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) bindet (Signal 1), auch zusätzliche kostimulatorische (Signal 2) und inflammatorische (Signal 3) Signale, die Antigen-unabhängig sind (Crawford und Wherry, 2009). Die TZR-vermittelte Aktivierung von T-Zellen in Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen resultiert in einer Anergie der T-Zellen, so dass diese bei einem wiederholten Antigen-Kontakt nicht mehr reagieren können (Sharpe, 2009). Bei den T-Zellkostimulatoren handelt es sich um Oberflächenmoleküle, die durch Ligation alleine keine T-Zellaktivierung hervorrufen können, sondern das über den TZR-vermittelte Signal verstärken oder abschwächen (Kroczek et al., 2004). Wenn kostimulatorische Rezeptoren ihren entsprechenden Liganden binden, wird das Signal über den Rezeptor, nicht aber über den Liganden übermittelt.

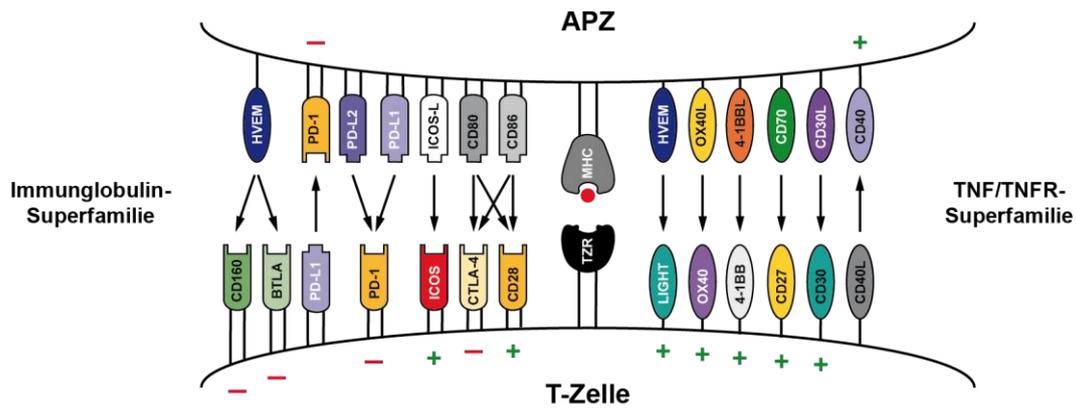


Abb. 1: Kostimulatorische Moleküle.

Kostimulatorische Moleküle können der Immunglobulin-Superfamilie oder der TNF/TNFR-Superfamilie angehören. Stimulatorische (+) und inhibitorische (-) Kostimulatoren auf T-Zellen und APZ sowie die Interaktion mit ihren Liganden sind exemplarisch dargestellt. Rezeptoren und Liganden der gleichen Familie interagieren miteinander, wobei die Interaktion von BTLA und CD160 mit HVEM eine Ausnahme darstellt.

Die Kostimulatoren können strukturell in zwei Familien unterteilt werden: die Immunglobulin-Superfamilie, welche auch die CD28-Familie einschließt, und die Tumor-Nekrose-Faktor/Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF/TNFR)-Familie. Desweiteren unterscheidet man zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Kostimulatoren, die positive bzw. negative Signale liefern (Abb. 1). Einige Kostimulatoren werden konstitutiv exprimiert (wie z.B. CD28, BTLA und CD27); einige jedoch werden erst nach Aktivierung der T-Zelle induziert (z.B. ICOS, PD-1, OX40 und CTLA-4) (Crawford und Wherry, 2009; Kroczeck et al., 2004; Sharpe, 2009). Dadurch unterscheiden sich Expressionsmuster und Funktion der kostimulatorischen Moleküle nicht nur auf den verschiedenen T-Zellsubtypen, sondern hängen auch vom Aktivierungsstatus der T-Zelle ab (Kroczeck et al., 2004). Während die Expression einiger Kostimulatoren nur auf T-Zellen beschränkt ist (z.B. ICOS und CTLA-4), können andere Kostimulatoren auch auf aktivierten B-Zellen exprimiert werden (z.B. PD-1, CD27, BTLA) (Crawford und Wherry, 2009; Kroczeck et al., 2004). Die Liganden der kostimulatorischen Rezeptoren können von professionellen APZ wie DZ, B-Zellen und Makrophagen exprimiert werden, einige werden aber zusätzlich auch in der Peripherie von Endothel- oder Epithelzellen exprimiert (Kroczeck et al., 2004). Liganden wie CD40L (CD40-Ligand) und PD-L1 (PD-Ligand 1) können sogar von T-Zellen exprimiert werden; deren kostimulatorische Rezeptoren werden von APZ exprimiert, und entsprechend erfolgt das kostimulatorische Signal nach Rezeptor-Ligand-Interaktion in die APZ (Crawford und Wherry, 2009; Kroczeck et al., 2004). Nicht jeder Rezeptor besitzt seinen eigenen Liganden und andersherum. So können sowohl der Kostimulator CD28 als auch der Koinhibitor CTLA-4 an die Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) binden, ebenso kann PD-1 mit PD-L1 und PD-L2 (PD-Ligand 2) interagieren (Abb. 1). Interessanterweise gibt es auch Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen Mitgliedern der unterschiedlichen Familien, so binden die Immunglobulin-Superfamilie-Mitglieder BTLA und CD160 an den Liganden HVEM aus der TNF-Familie (Crawford und Wherry, 2009). Die T-Zellkostimulation ist insgesamt ein sehr

komplexes System, und erst das Zusammenspiel von diversen stimulatorischen und inhibitorischen Kostimulatoren entscheidet über das Resultat der T-Zellaktivierung. Das Immunsystem kann dadurch eine Balance zwischen protektiver Immunantwort gegen Pathogene und Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen herstellen (Crawford und Wherry, 2009).

Das vermutlich bekannteste und am besten untersuchte Rezeptor-Liganden-Paar stellt CD28/CTLA-4-CD80/CD86 dar. Trotzdem sind noch nicht alle Signalmechanismen komplett verstanden. CD28 wird konstitutiv exprimiert und bindet an die Liganden CD80 und CD86 auf APZ. CD86 wird zwar konstitutiv, aber nur schwach exprimiert und nach Aktivierung hochreguliert, CD80 hingegen wird nur aktivierungsbedingt exprimiert. Durch die Hochregulation von CD80 und CD86 verstärkt sich die Kostimulation über CD28. Diese bewirkt unter anderem die Produktion der Interleukine IL-2, IL-4 und IL-5 sowie die Expression von anti-apoptotischen Molekülen, wodurch die aktivierten T-Zellen expandieren und besser überleben. Durch die T-Zellaktivierung wird außerdem die Expression des Koinhibitors CTLA-4 induziert, der mit einer höheren Affinität als CD28 an CD80 und CD86 bindet und somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus für die T-Zellaktivierung liefert (Kallinich et al., 2005; Kroczek et al., 2004). Wie wichtig eine Drosselung der T-Zellaktivierung durch inhibitorische Kostimulatoren ist, verdeutlicht der Phänotyp von CTLA-4 *knock-out* (KO) Mäusen, in denen sich innerhalb der ersten Lebenswochen eine tödliche lymphoproliferative Krankheit ausbildet und aktivierte T-Zellen verschiedene Organe infiltrieren (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). CD28 scheint an der sehr frühen T-Zellaktivierung beteiligt zu sein und verstärkt die Expression von ICOS, OX40 und CD40L. Dadurch ergibt sich zudem eine hierarchische Abhängigkeit in der Expression der Kostimulatoren untereinander (Kroczek et al., 2004).

3.2.1 ICOS und ICOS-L

Der induzierbare Kostimulator ICOS (*inducible costimulator*) wurde neben CD28 und CTLA-4 als drittes Mitglied der CD28-Familie identifiziert und ist ein glykosyliertes Disulfid-verbundenes Homodimer (Hutloff et al., 1999). ICOS wird im Gegensatz zu CD28 erst nach T-Zellaktivierung auf CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen exprimiert, und die Expression wird, wie bereits erwähnt, durch CD28-Kostimulation weiter verstärkt (Beier et al., 2000; Hutloff et al., 1999; McAdam et al., 2000). Dabei konnte die Expression von ICOS nicht nur auf unpolarisierten aktivierten T-Zellen, sondern auch auf T_H1-, T_H2-, T_H17-, T_{FH}- und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) sowie Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen werden (Akiba et al., 2005; Burmeister et al., 2008; Coyle et al., 2000; Herman et al., 2004; Ito et al., 2008; McAdam et al., 2000; Nakae et al., 2007; Tan et al., 2008; Yoshinaga et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor NFATc2 reguliert sowohl in differenzierten T_H1- als auch T_H2-Zellen die Transkription von *Icos*, allerdings durch unterschiedliche Mechanismen. In T_H1-Zellen bindet NFATc2 zusammen mit T-bet an den *Icos*-Promotor und in T_H2-Zellen zusammen mit GATA-3 an die 3'-untranslatierte Region (UTR, *untranslated region*) von *Icos* (Tan et al., 2008). In T_{reg}-Zellen

hingegen bindet IRF4 (*interferon regulatory factor-4*) zusammen mit Foxp3 an den *Icos*-Promotor und induziert somit eine IRF4-abhängige ICOS-Expression (Zheng et al., 2009). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 durch Bindung an ein AP-1-responsives Element im *Icos*-Promotor die ICOS-Expression hochreguliert (Watanabe et al., 2012). Posttranskriptional wird die ICOS-Expression durch die RING-Typ Ubiquitin-Ligase Roquin reguliert. Durch die direkte Bindung von Roquin an die 3'-UTR der *icos* mRNA wird diese degradiert und die Expression infolgedessen reprimiert (Glasmacher et al., 2010; Vinuesa et al., 2005; Yu et al., 2007).

ICOS besitzt nur einen Liganden – ICOS-Ligand (ICOS-L), der auch B7RP-1, LICOS, B7h, B7-H2, GL50 oder CD275 genannt wird (Aicher et al., 2000; Brodie et al., 2000; Ling et al., 2000; Mages et al., 2000; Swallow et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999). ICOS-L wird konstitutiv auf B-Zellen, DZ, Makrophagen sowie schwach auf T-Zellen exprimiert, kann aber auch im peripheren Gewebe von nicht-lymphoiden Zellen wie Endothelzellen durch inflammatorische Signale (z.B. LPS, TNF α) hochreguliert werden (Khayyamian et al., 2002; Ling et al., 2000; Swallow et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999). Durch Ligation des B-Zellrezeptors (BZR) auf aktivierten B-Zellen und durch die IL-4R (IL-4-Rezeptor)-Signaltransduktion in naiven und aktivierten B-Zellen wird ICOS-L auf der Zelloberfläche runterreguliert. Die Kostimulation der B-Zellen über CD40, das mit CD40L auf aktivierten T-Zellen interagiert, kann ICOS-L jedoch wieder hochregulieren (Liang et al., 2002). Interessanterweise kann die ICOS-L-Expression auf posttranskriptionaler Ebene auch direkt durch die Interaktion mit ICOS supprimiert werden (Watanabe et al., 2008). Durch die Regulation der ICOS-L-Expression auf B-Zellen kann somit auch die Kostimulation von Antigen-spezifischen T-Zellen über ICOS durch eine negative Rückkopplungsschleife indirekt kontrolliert werden.

Die Signaltransduktion über ICOS in aktivierten T-Zellen führt zur Proliferation, Zytokinproduktion (u.a. IFN- γ (Interferon- γ), IL-4 und IL-10) und Hochregulation von weiteren Oberflächenmolekülen (Dong et al., 2001a; Hutloff et al., 1999; McAdam et al., 2000). Im Gegensatz zur CD28-Kostimulation wird durch ICOS-Kostimulation keine IL-2-Sekretion bewirkt (Hutloff et al., 1999; McAdam et al., 2000). ICOS spielt insbesondere für die humorale Immunantwort eine wichtige Rolle. So wurden ICOS⁺ T-Zellen zuerst in Keimzentren von humanen Tonsillen identifiziert (Hutloff et al., 1999). In ICOS-defizienten Mäusen ist die Bildung von Keimzentren sowie der Immunglobulin-Klassenwechsel nach Immunisierung beeinträchtigt (Dong et al., 2001a; Dong et al., 2001b; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001). Der verminderte Immunglobulin-Klassenwechsel kann aber durch CD40-Stimulation wiederhergestellt werden, was darauf hindeutet, dass ICOS die T-/B-Zell-Zusammenarbeit über den CD40-CD40L-Signalweg fördert (McAdam et al., 2001). In ICOS-L-defizienten Mäusen ist ein ähnlicher Phänotyp wie in ICOS-defizienten Mäusen zu beobachten (Mak et al., 2003; Nurieva et al., 2003b; Wong et al., 2003). Eine Deletion von *Icos* in humanen Patienten manifestiert sich in der Krankheit CVID (*common variable immunodeficiency*). Eine Gruppe dieser Patienten weist eine reduzierte Anzahl sowohl an naiven und klassengewechselten B-Zellen als auch

an Gedächtnis-B-Zellen auf, woraus wiederholende bakterielle Infektionen aber auch Autoimmunität resultieren. Die T-Zellhomöostase scheint allerdings nicht beeinträchtigt (Grimbacher et al., 2003; Warnatz et al., 2006). Bei weiteren Patienten mit einer anderen Mutation hingegen konnte eine verringerte Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen und eines T_{reg} -Subtyps sowie eine beeinträchtigte Produktion von T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zytokinen und eine verminderte Hochregulation von Oberflächenmolekülen nachgewiesen werden (Takahashi et al., 2009). Die Defekte der humoralen Immunantwort in ICOS-defizienten Mäusen und Patienten sowie durch Blockade des ICOS-Signalweges durch Antikörper wurden später auf eine beeinträchtigte Bildung von $CXCR5^+$ T_{FH} -Zellen zurückgeführt, die in verminderter Anzahl vorliegen (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006).

3.2.2 Signaltransduktion über ICOS und CD28

Die zytoplasmatische Domäne von ICOS enthält ein YMFM-Motiv und die von CD28 ein YMNМ-Motiv, an deren phosphoryliertes Tyrosin jeweils die Klasse IA Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) binden kann. Diese setzt sich aus einer katalytischen (p110 α , p110 β oder p110 δ) und einer regulatorischen Untereinheit (p85 α , p50 α , p85 β , p55 α oder p55 γ) zusammen (Rudd und Schneider, 2003). Die Kostimulation über ICOS führt zu einer Rekrutierung der p50 α - und p85 α -Untereinheit, während von CD28 nur die p85 α -Untereinheit rekrutiert wird (Fos et al., 2008). Da p50 α eine stärkere Lipidkinase-Aktivität als p85 α aufweist, kann ICOS eine stärkere Aktivierung der PI3K und nachfolgend eine stärkere Phosphorylierung von Akt/PKB (Proteinkinase B) hervorrufen als CD28 (Arimura et al., 2002; Fos et al., 2008; Parry et al., 2003). Die Signaltransduktion über ICOS und CD28 kann durch IL-10 supprimiert werden. Die IL-10R-assoziierte Kinase Tyk-2 phosphoryliert innerhalb weniger Minuten die Phosphatase SHP-1 (*SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*), die daraufhin an ICOS und CD28 bindet und deren YMFM- bzw. YMNМ-Motiv dephosphoryliert. Dadurch kann die PI3K nicht mehr an ICOS und CD28 binden und die Signaltransduktion wird unterbrochen (Taylor et al., 2007).

Der PI3K-Aktivierung nachfolgend führt die ICOS-Kostimulation über I κ k, die Phospholipase $C\gamma 1$ und einen Ca^{2+} -Einstrom in die T-Zellen zur Transkription von *Nfatc1* (Nurieva et al., 2007). NFATc1 wiederum bewirkt zusammen mit einer initialen IL-4-Produktion in der frühen T-Zelldifferenzierung die Expression des Transkriptionsfaktors c-Maf (Nurieva et al., 2003a), der die IL-4- (Ho et al., 1996) und IL-21-Produktion reguliert (Bauquet et al., 2009).

Eine *knock-in* Maus mit einer Tyrosin-zu-Alanin-Mutation im YMFM-Motiv von ICOS, die die Rekrutierung der PI3K unterbindet, zeigt schwere Defekte in der Generierung von T_{FH} -Zellen, der Bildung von Keimzentren, dem Immunglobulin-Klassenwechsel und der Affinitätsreifung (Gigoux et al., 2009). Weiterhin ist die katalytische Untereinheit der PI3K p110 δ in T-Zellen, aber nicht in B-Zellen, wichtig für die Bildung von T_{FH} -Zellen und für die Keimzentrum-Reaktion sowie für die

ICOS-abhängige Transkription von *Maf* (kodiert c-Maf), *Il4* und *Il21* (Rolf et al., 2010). Diese Studien unterstreichen die Bedeutung und nicht-redundante Funktion des ICOS-PI3K-Signalweges für diese Prozesse.

3.3 Follikuläre T-Helferzellen

CD4⁺ T-Zellen können nach Antigen-Kontakt in unterschiedliche Effektor-T-Zellsubtypen differenzieren, die verschiedene Funktionen in Abhängigkeit von der Immunantwort ausüben. T_{H1}-Zellen spielen zum Beispiel in der antiviralen und bakteriellen Immunabwehr eine wichtige Rolle und produzieren IFN- γ und TNF, während T_{H2}-Zellen mit der Bekämpfung von extrazellulären Parasiten und der Produktion von IL-4 und IL-13 assoziiert sind. Jeder Effektor-T-Zellsubtyp ist dabei durch die Expression eines bestimmten Mastertranskriptionsfaktors charakterisiert, der für die Differenzierung in den jeweiligen Subtyp verantwortlich ist. T_{H1}-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet, T_{H2}-Zellen GATA-3, T_{H17}-Zellen ROR γ t und T_{reg}-Zellen Foxp3. In den letzten Jahren haben sich die T_{FH}-Zellen als unabhängiger Subtyp etabliert. Diese können B-Zellhilfe leisten und sind somit für die Ausbildung von Keimzentren, für den Immunglobulin-Klassenwechsel und die Affinitätsreifung sowie für die Entwicklung von langanhaltendem serologischem Gedächtnis notwendig. Eine übermäßige Anzahl an T_{FH}-Zellen liegt hingegen bei autoimmunen Erkrankungen mit Auto-Antikörper-Produktion vor (King et al., 2008; Ma et al., 2012).

3.3.1 Definition und Subtypen von T_{FH}-Zellen

Die T_{FH}-Zellen wurden anhand der Expression des Chemokinrezeptors CXCR5, die ihnen die Lokalisation im B-Zellfollikel und damit den Kontakt mit Antigen-spezifischen B-Zellen ermöglicht, und ihrer Fähigkeit zur B-Zellhilfe identifiziert (Breitfeld et al., 2000; Campbell et al., 2001; Kim et al., 2001; Schaerli et al., 2000). Neben der Expression von CXCR5 ist auch die Runterregulation des Chemokinrezeptors CCR7 erforderlich, damit die T_{FH}-Zellen aus der T-Zellzone bzw. von der T-/B-Zellgrenze in die B-Zellfollikel einwandern können (Ansel et al., 1999; Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007). Naive T-Zellen hingegen exprimieren CCR7 und kein CXCR5 und sind daher in der T-Zellzone lokalisiert. Für T_{FH}-Zellen wurde die Expression von einer Reihe von Molekülen wie ICOS, PD-1, CD40L, OX40, CXCR4, CD200, BTLA, CD84, SLAM, SAP (*SLAM-associated protein*) und dem Zytokin IL-21 beschrieben. Gleichzeitig weisen sie eine geringe Expression von CD62L und CD127 (IL-7R α) auf (Crotty, 2011; Deenick und Ma, 2011; Ma et al., 2012). T_{FH}-Zellen sind recht heterogen und können für T_{H1}-, T_{H2}- bzw. T_{H17}-Zellen typische Zytokine sezernieren. So wurde die Produktion sowohl von IL-4, die unabhängig von der T_{H2}-Zelldifferenzierung ist, als auch von IFN- γ und IL-17 beobachtet (Bauquet et al., 2009; Fazilleau et al., 2009b; King und Mohrs, 2009; Reinhardt et al., 2009; Zaretsky et al., 2009). In T_{FH}-/B-Zellkonjugaten korrelierte die spezifische Zytokinproduktion (IL-4 oder IFN- γ) der T_{FH}-Zellen mit dem entsprechenden Immunglobulin-

Klassenwechsel in den konjugierten B-Zellen (Reinhardt et al., 2009). Vor kurzem wurde ein weiter polarisierter Subtyp von T_{FH} -Zellen – die sogenannten GC T_{FH} -Zellen (GC assoziierte T_{FH} -Zellen) – beschrieben, die $GL7^+$ sind und im Keimzentrum lokalisiert sind. Die GC T_{FH} -Zellen besitzen eine erhöhte Fähigkeit zur B-Zellhilfe und können neben IL-21 auch IL-4 produzieren (Yusuf et al., 2010).

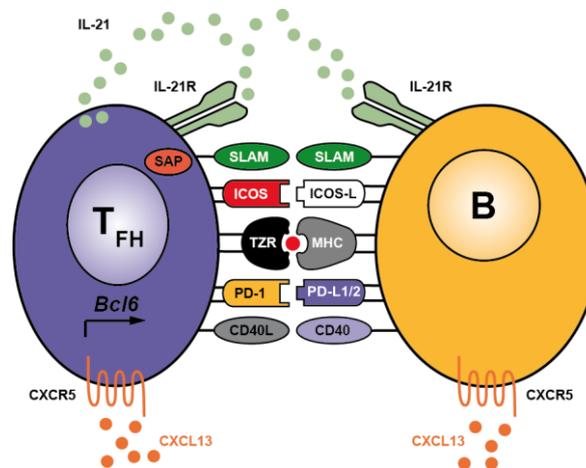


Abb. 2: Interaktion von T_{FH} -Zellen und B-Zellen.

An der Interaktion zwischen T_{FH} -Zellen und B-Zellen, denen die T_{FH} -Zellen in der Keimzentrums-Reaktion Hilfe leisten, sind neben der TZR-Peptid-MHCII-Ligation auch verschiedene kostimulatorische Moleküle beteiligt, von denen einige dargestellt sind. SAP assoziiert intrazellulär mit SLAM. T_{FH} - sowie B-Zellen exprimieren CXCR5, weswegen sie in den CXCL13-reichen B-Zellfollikeln lokalisiert sind, als auch IL-21R. T_{FH} -Zellen produzieren IL-21, das sowohl autokrin auf sie selber als auch auf die B-Zellen wirken kann. BCL-6 ist der Mastertranskriptionsfaktor der T_{FH} -Zellen.

3.3.2 Differenzierung von T_{FH} -Zellen

Als Mastertranskriptionsfaktor, der die Differenzierung von T_{FH} -Zellen vorantreibt, wurde BCL-6 (*B cell leukemia/lymphoma 6*) identifiziert. Dabei ist die Expression von BCL-6 sowohl notwendig als auch ausreichend für die Differenzierung. Gleichzeitig ist die Runterregulation von BLIMP-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) – einem Antagonisten von BCL-6, der die T_{FH} -Zelldifferenzierung inhibiert – durch den transkriptionalen Repressor BCL-6 erforderlich. BCL-6 und BLIMP-1 sind somit Gegenspieler (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). BCL-6 kann die Differenzierung zu anderen Effektor-T-Zellsubtypen unterdrücken, indem es die Transkriptionsfaktoren T-bet (T_H1), GATA-3 (T_H2) und ROR γ t (T_H17) durch Bindung an deren Promotor oder durch Blockade ihrer Funktion inhibiert (Crotty, 2011; Ma et al., 2012). Aber auch viele micro-RNAs (miRNA), die die Expression von T_{FH} -Zell-spezifischen Genen inhibieren, werden durch BCL-6 inhibiert (Yu et al., 2009). Weiterhin wurden die Transkriptionsfaktoren BATF, der direkt die Expression von BCL-6 und c-Maf kontrolliert (Betz et al., 2010; Ise et al., 2011), und IRF4 (Bollig et al., 2012; Kwon et al., 2009) mit der Differenzierung zu T_{FH} -Zellen in Verbindung gebracht. STAT5 hingegen ist ein negativer Regulator der T_{FH} -Zelldifferenzierung und -funktion (Johnston et al., 2012; Nurieva et al., 2012).

Obwohl die Existenz von T_{FH} -Zellen für die Generierung von Keimzentren notwendig ist, konnte umgekehrt auch gezeigt werden, dass die Differenzierung von T_{FH} -Zellen von der Präsenz von B-Zellen bzw. Keimzentrums-B-Zellen (GC B-Zellen) abhängt. In Abwesenheit von Antigen-spezifischen B-Zellen kann BCL-6 nicht in T-Zellen induziert werden und keine T_{FH} -Zelldifferenzierung stattfinden (Akiba et al., 2005; Haynes et al., 2007; Johnston et al., 2009). Die Studien von Akiba und Kollegen legen außerdem eine Rolle der ICOS-ICOS-L-Interaktion zwischen T- und B-Zellen nahe (Akiba et al., 2005). In der Tat weisen ICOS-defiziente Tiere eine reduzierte Anzahl an T_{FH} -Zellen auf (siehe 3.2.1) (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006). Auch wenn Mäusen ICOS-L nur auf den B-Zellen fehlt, können nur wenige T_{FH} -Zellen gebildet werden (Nurieva et al., 2008; Pepper et al., 2011). Über die ICOS-Signaltransduktion werden mehrere T_{FH} -Zell-assoziierte Proteine wie c-Maf, IL-4 und IL-21 hochreguliert (Bauquet et al., 2009; Gigoux et al., 2009; Nurieva et al., 2003a; Rolf et al., 2010; Vogelzang et al., 2008). Ob ICOS allerdings für die Induktion der T_{FH} -Zelldifferenzierung oder für die Aufrechterhaltung der bereits gebildeten T_{FH} -Zellen wichtig ist, muss noch untersucht werden (Deenick und Ma, 2011). In *sanroque*-Mäusen, die aufgrund einer Mutation in Roquin eine erhöhte ICOS-Expression besitzen, werden übermäßig viele T_{FH} -Zellen, eine erhöhte IL-21-Produktion und eine Entwicklung von Autoimmunität beobachtet (Vinuesa et al., 2005). Weitere Rezeptor-Liganden-Interaktionen scheinen ebenfalls eine wichtige Bedeutung für die Generierung von T_{FH} -Zellen zu haben. So sind in Abwesenheit von Signalen durch CD28 oder der CD40-CD40L-Interaktion nur eine verminderte Anzahl an T_{FH} -Zellen und eine beeinträchtigte Keimzentrums-Reaktion zu beobachten, während die OX40-OX40L-Interaktion für die Hochregulation von CXCR5 und die Wanderung der T-Zellen in die B-Zellfollikel notwendig ist (Deenick und Ma, 2011; Ma et al., 2012). Desweiteren können SAP-defiziente T-Zellen nicht zu GC T_{FH} -Zellen differenzieren (Yusuf et al., 2010). Die Rolle von IL-21 und IL-6 für die T_{FH} -Zelldifferenzierung wird derzeit noch diskutiert. Einige Studien weisen auf eine Notwendigkeit von IL-21 für die T_{FH} -Zelldifferenzierung hin und schlagen für die T_{FH} -Zellen eine autokrine Rückkopplung des von ihnen sezernierten IL-21 über ihren IL-21R vor (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008). Unterdessen zeigten andere Studien keinen Defekt auf die T_{FH} -Zellentwicklung bei Unterbrechung der IL-21-Signale (Eto et al., 2011; Linterman et al., 2010; Poholek et al., 2010; Zotos et al., 2010). Möglicherweise ist dies auf eine teilweise Redundanz dieser Zytokine (IL-21, IL-6, aber auch IL-27), deren Signaltransduktion jeweils über STAT3 läuft, für die Generierung der T_{FH} -Zellen zurückzuführen (Deenick und Ma, 2011).

3.4 Keimzentrums-Reaktion und Bildung von B-Zell-Gedächtnis

Voraussetzung für die Aktivierung von naiven B-Zellen und deren Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen ist die Erkennung von Antigen über ihren Antigen-spezifischen BZR. B-Zellen können lösliches Antigen oder membran-gebundenes Antigen von DZ, folliculären DZ (FDZ) oder Makrophagen aufnehmen (Batista und Harwood, 2009). Nach diesem sogenannten *Priming* prozessieren die B-Zellen das Antigen, präsentieren Antigen-abgeleitete Peptide über MHCII-Moleküle und wandern Chemokin-abhängig zur T-/B-Zellgrenze. Dort treffen die aktivierten B-Zellen auf T-Zellen mit derselben Antigen-Spezifität. Die T-Zellen müssen zuvor von DZ, die den jeweils für sie spezifischen Peptid-MHCII-Komplex präsentieren, aktiviert werden und von der T-Zellzone in Richtung B-Zellfollikel wandern (McHeyzer-Williams et al., 2012; Tarlinton, 2006) (Abb. 3).

Nach der T-/B-Zellinteraktion dieser pre-GC-Phase bestehen zwei Möglichkeiten für die weitere Differenzierung der aktivierten B-Zellen: einige T-/B-Zellkonjugate wandern in die B-Zellfollikel ein und gründen ein Keimzentrum, andere aktivierte B-Zellen wandern in extrafollikuläre Regionen, um eine extrafollikuläre Reaktion außerhalb des Keimzentrums zu induzieren (Gatto und Brink, 2010; McHeyzer-Williams et al., 2012; Tarlinton, 2006). Diese Reaktion dient der schnellen Produktion von Antikörpern nach initialem Antigen-Kontakt, bevor die langsamere Keimzentrums-Reaktion etabliert ist (Gatto und Brink, 2010; MacLennan et al., 2003). Extrafollikulär werden nur kurzlebige Antikörper-sezernierende Plasmazellen gebildet, in denen ein Immunglobulin-Klassenwechsel stattfinden kann (McHeyzer-Williams et al., 2012; Tarlinton, 2006) (Abb. 3).

Das Keimzentrum ist eine mikroanatomische Struktur in der folliculären Region von sekundärlymphatischem Gewebe und dient der Generierung von langlebigen und hochaffine Antikörper-sezernierenden Plasmazellen sowie Gedächtnis-B-Zellen (Abb. 3). Dadurch wird eine anhaltende Immunprotektion und eine schnelle Sekundärantwort bei wiederholtem Antigen-Kontakt gewährleistet (Gatto und Brink, 2010; McHeyzer-Williams et al., 2012). Das Keimzentrum ist in eine helle Zone, in der FDZs und GC T_{FH}-Zellen vorliegen, und eine dunkle Zone, in der viele proliferierende B-Zellen vorhanden sind, unterteilt (McHeyzer-Williams et al., 2012; Tarlinton, 2006). Die verschiedenen Prozesse der Keimzentrums-Reaktion sind jeweils auf eine der beiden Zonen begrenzt und die GC B-Zellen wandern während ihrer Differenzierung kontinuierlich zwischen diesen beiden Zonen hin und her. Wie in *Imaging*-Studien gezeigt werden konnte, proliferieren die B-Zellen ausschließlich in der dunklen Zone, bevor sie zurück in die helle Zone wandern (Victoria et al., 2010). In der dunklen Zone finden auch die somatische Hypermutation, die der Diversifikation des BZR-Repertoires und infolgedessen der Affinitätsreifung der GC B-Zellen zugrunde liegt, und der Immunglobulin-Klassenwechsel statt. Beide Prozesse können nur während des Zellzyklus ablaufen. Die somatische Hypermutation wird durch das Enzym AID (*activation-induced cytidine deaminase*) induziert, das Cytosin zu Uracil desaminiert. Anschließend schneidet das Enzym UNG (*uracil DNA*

glycosylase) den Uracil-Rest aus, und durch die fehleranfällige DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Replikation werden Punktmutationen in die variablen Regionen des BZR eingefügt (McHeyzer-Williams et al., 2012). Nach Beendigung des Zellzyklus wandern die GC B-Zellen in die helle Zone, wo sie die FDZs kontinuierlich auf gebundene Immunkomplexe abtasten (*Imaging*-Studien von Allen et al., 2007; Hauser et al., 2007; Schwickert et al., 2007). Dadurch wird der mutierte BZR auf Antigen-Bindung getestet. Erfolgt kein positives Signal über den BZR, so tritt Apoptose ein. Erfolgt ein positives BZR-Signal und nimmt die GC B-Zelle Antigen auf und präsentiert die prozessierten Peptide über MHCII-Moleküle, kommt ein stabiler Synapsen-ähnlicher Kontakt zwischen einigen GC B-Zellen und Antigen-spezifischen GC T_{FH}-Zellen zustande (Allen et al., 2007; McHeyzer-Williams et al., 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass die T-Zellhilfe und nicht die Konkurrenz um Antigen der limitierende Faktor in der Keimzentrums-Selektion ist (Allen et al., 2007; Victora et al., 2010). Die wiederholte somatische Hypermutation des BZR und die folgende positive Selektion auf GC B-Zellen mit einem höher affinen BZR führt zur Affinitätsreifung der GC B-Zellen. Nach der T-/B-Zellinteraktion können die GC B-Zellen weiter im Keimzentrums-Zyklus verbleiben und für die weitere klonale Expansion und BZR-Diversifikation wieder in die dunkle Zone wandern oder die Keimzentrums-Reaktion als affinitätsgereifte Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen verlassen (McHeyzer-Williams et al., 2012).

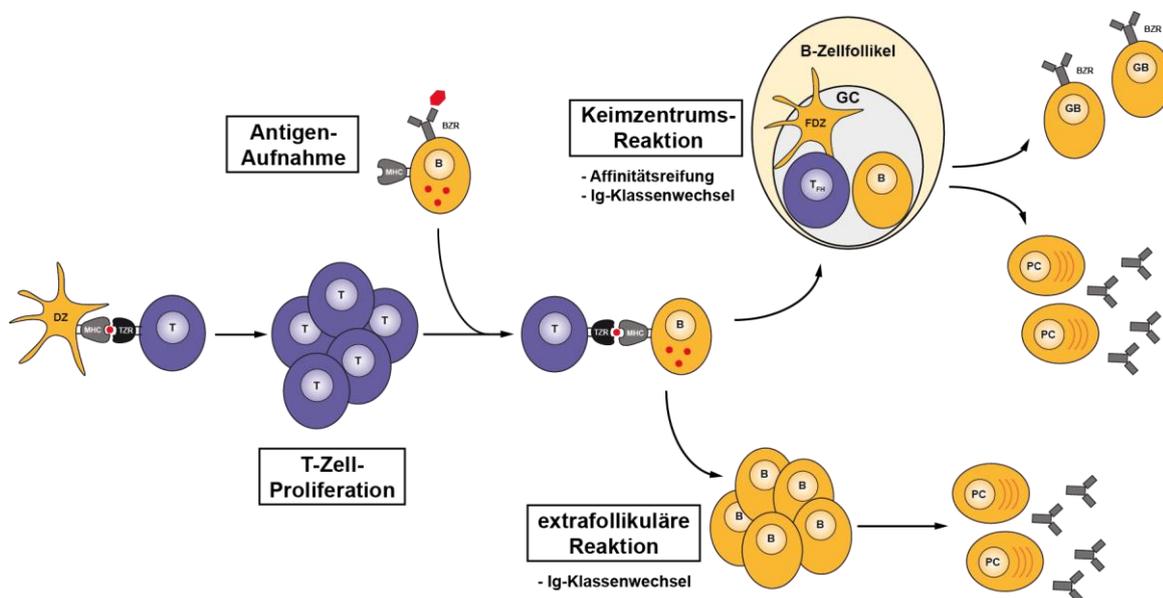


Abb. 3: Bildung von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen in Keimzentrums-Reaktion und extrafollikulärer Reaktion.

Antigen-spezifische T-Zellen werden von DZ aktiviert und beginnen zu proliferieren. Danach interagieren sie an der T-/B-Zellgrenze mit Antigen-spezifischen B-Zellen, die Antigen aufgenommen und prozessiert haben und dann Antigen-abgeleitete Peptide über MHCII-Moleküle den T-Zellen präsentieren. Die T-/B-Zellkonjugate können entweder eine Keimzentrums-Reaktion im B-Zellfollikel etablieren oder in der extrafollikulären Region eine extrafollikuläre Reaktion induzieren. In der extrafollikulären Reaktion werden kurzlebige Plasmazellen gebildet, während in der Keimzentrums-Reaktion langlebige Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen gebildet werden. Im Gegensatz zum Immunglobulin (Ig)-Klassenwechsel findet die Affinitätsreifung nur im Keimzentrum statt.

Verschiedene Klassen von hochaffine Antikörper-sezernierenden Plasmazellen sowie nicht-sekretierenden Gedächtnis-B-Zellen sind für ein effektives B-Zell-Gedächtnis erforderlich. Dabei übernehmen die verschiedenen schweren Ketten der Immunglobuline unterschiedliche Funktionen in der Bekämpfung von Pathogenen (McHeyzer-Williams et al., 2012). B-Zellen können zu einem gegebenen Zeitpunkt immer nur einen bestimmten Isotyp sekretieren. Der Immunglobulin-Klassenwechsel ist eine irreversible genetische Rekombination und wird wie die somatische Hypermutation durch das Enzym AID induziert. Im Gegensatz zur somatischen Hypermutation kann der Immunglobulin-Klassenwechsel aber sowohl in der Keimzentrums-Reaktion als auch in der extrafollikulären Reaktion stattfinden. Lösliche Stoffe, die von T-Zellen und anderen Zellen während der Immunantwort sezerniert werden, regulieren den Klassenwechsel (McHeyzer-Williams et al., 2012). In Abhängigkeit von den vorliegenden Zytokinen werden unterschiedliche Immunglobulin-Klassen gebildet. IL-4 induziert den Klassenwechsel zu IgG1 und IgE (Snapper und Paul, 1987), während IFN- γ den Klassenwechsel zu IgG2a (Snapper und Paul, 1987) und TGF- β zu IgA und IgG2b induziert (Cazac und Roes, 2000; Coffman et al., 1989; McIntyre et al., 1993; Sonoda et al., 1989). Allerdings konnte auch ein Zytokin-unabhängiger Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG1 nach BZR-Ligation nachgewiesen werden, der von der Affinität des Antigens abhängig war (Turner et al., 2010).

Der Transkriptionsfaktor BCL-6 wird in hohem Maße von GC B-Zellen exprimiert und ist für deren Generierung notwendig (Dent et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ye et al., 1997). In GC B-Zellen reprimiert BCL-6 die Expression von ~1200 Genen, die unter anderem für Aktivierung, Überleben, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Zytokin-Signaltransduktion und Differenzierung eine Rolle spielen (Basso et al., 2010). Insbesondere supprimiert BCL-6 die Expression von *Prdm1* (*PR domain containing 1, with ZNF domain*), das BLIMP-1 kodiert, und inhibiert somit die Differenzierung zu Plasmazellen im Keimzentrum (Tunayaplin et al., 2004). BLIMP-1 fördert als transkriptionaler Repressor die terminale Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (Turner et al., 1994), indem es für die BZR-Signaltransduktion, GC B-Zellfunktion und Proliferation wichtige Gene unterdrückt und andererseits für die Immunglobulin-Sezernierung notwendige Gene induziert (Shaffer et al., 2002). Von besonderer Bedeutung ist dabei die Aktivierung von *Xbp1* (*X-box-binding protein 1*), das für die terminale Differenzierung zu Plasmazellen notwendig ist. XBP-1 expandiert den sekretorischen Apparat und die Proteinsynthese und ermöglicht dadurch die Produktion von großen Antikörpermengen (Reimold et al., 2001; Shaffer et al., 2004). Auch *Bcl6* wird von BLIMP-1 direkt supprimiert (Cimmino et al., 2008). BCL-6 und BLIMP-1 sind daher wie in den T_{FH}-Zellen Antagonisten, die ihre Expression gegenseitig inhibieren können.

3.5 Zielsetzung

Sowohl für T_{FH} -Zellen als auch für den Kostimulator ICOS wurde in der Literatur bereits eine wichtige Rolle für die humorale Immunantwort beschrieben. Außerdem war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass bei fehlender ICOS-ICOS-L-Interaktion nur sehr wenige T_{FH} -Zellen gebildet werden und die Keimzentrums-Reaktion beeinträchtigt ist. Obwohl in den vergangenen Jahren der Mastertranskriptionsfaktor der T_{FH} -Zellen sowie weitere für die Differenzierung zu T_{FH} -Zellen notwendige Transkriptionsfaktoren und Moleküle identifiziert wurden, ist der genaue Mechanismus der T_{FH} -Zelldifferenzierung bislang ungeklärt. Trotz seiner bekannten Bedeutung für T_{FH} -Zellen ist die Funktion von ICOS für die T_{FH} -Zelldifferenzierung ebenfalls noch unklar. Insbesondere ist bisher nicht untersucht worden, ob ICOS für die initiale Differenzierung zu T_{FH} -Zellen oder für bereits differenzierte T_{FH} -Zellen z.B. für das Überleben eine bedeutende Rolle spielt.

Um einen genauen Aufschluss über die Bedeutung von ICOS für T_{FH} -Zellen bzw. deren Differenzierung zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Dissertation der Einfluss einer fehlenden ICOS-Kostimulation auf die frühe T-Zellaktivierung bzw. T_{FH} -Zelldifferenzierung sowie zu späten Zeitpunkten auf bereits differenzierte T_{FH} -Zellen analysiert. Außerdem sollte aufgeklärt werden, ob die beeinträchtigte T_{FH} -Zellgenerierung bei ausbleibenden ICOS-Signalen auf T-Zell-intrinsischen oder -extrinsischen Effekten beruht. Die Untersuchungen fanden unter Verwendung eines T-/B-Kooperationssystems in einem Mausmodell *in vivo* statt, das bereits im Labor etabliert war und auf dem adoptiven Zelltransfer von Antigen-spezifischen T- und B-Zellen beruht. Dieses *in vivo*-Modell wurde in einem ersten Schritt dieser Arbeit weiter optimiert, um T_{FH} -Zellen optimal analysieren zu können. Der Transfer von ICOS KO T-Zellen oder von T-Zellen in ICOS-L KO Rezipienten einerseits, sowie das Unterbinden der ICOS-Kostimulation durch die Applikation blockierender Antikörper andererseits, ermöglichte es, den Beitrag der ICOS-Kostimulation zu verschiedenen Zeitpunkten während der T_{FH} -Zelldifferenzierung zu untersuchen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Standardlösungen

Die folgenden Lösungen wurden in der Durchflusszytometrie (4.5), der magnetischen Zellsortierung (4.3.3) bzw. Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (4.5.4) eingesetzt.

FACS-PBS PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
 2,5 % FCS (fötales Kälberserum, Gibco)
 0,1 % NaN₃

MACS-PBS PBS
 0,5 % BSA (Bovines Serumalbumin, PAA Laboratories GmbH)

Die folgenden Zellkulturmedien wurden für die Isolierung von murinen Zellen (4.3.1), für die *in vitro*-Restimulation von Zellen (4.3.2) bzw. für die Färbung mit FLICA-Reagenz (4.5.3) verwendet.

R10F⁺/β-ME RPMI 1640 (Biochrom)
 10 % FCS (Gibco)
 1x Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)
 50 μM β-ME (β-Mercaptoethanol)

RPMI-komplett RPMI 1640
 10 % FCS (Gibco)
 50 μM β-ME
 1x Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)
 1 mM Na-Pyruvat (Sigma)
 1x nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA, Gibco)

4.1.2 Verwendete Antikörper und Fluorophore

Die für die Durchflusszytometrie (4.5), die magnetische Zellsortierung (4.3.3) oder die Immunfluoreszenz (4.7.2) verwendeten Antikörper wurden entweder kommerziell bezogen oder stammten aus laboreigenen Hybridomen und wurden an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll-a Protein (PerCP), Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7), Allophycocyanin (APC), Cyanin-5 (Cy5), Alexa Fluor 647 (A647), Alexa Fluor 700 (A700), Allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7),

Pacific Blue (PacB) und Pacific Orange (PacO) eingesetzt. Einige Antikörper wurden als Biotin (Bio)- oder Digoxigenin (Dig)-Konjugate in Kombination mit entsprechenden Sekundärreagenzien verwendet. Vor ihrem Einsatz wurden alle Antikörper auf ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis titriert.

Tab. 1: In der Durchflusszytometrie und magnetischen Zellsortierung verwendete Primärantikörper.

Antigen	Klon	Quelle	Referenz/Hersteller
B1-8-BZR (NP-spezifisch)	Ac146	Hybridom	Reth et al., 1979
BCL-6	K112-91	kommerziell	BD Pharmingen
B Lin ⁻	CD3 + CD8 + Ly-6G/C		
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari, 1988
CD4	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC: 87072282
CD4	RM4-5	kommerziell	eBioscience
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11c	N418	Hybridom	ATCC: HB-224
CD16/CD32	2.4G2	Hybridom	ATCC: HB-197
CD19	6D5	kommerziell	BioLegend
CD21/CD23	7G6	kommerziell	BD Biosciences Pharmingen
CD23	B3B4	kommerziell	eBioscience
CD25	2E4	Hybridom	Ortega et al., 1984
CD38	90	kommerziell	BioLegend
CD43	S7	kommerziell	BD Pharmingen
CD45.1	A20	kommerziell	eBioscience
CD45.2	104	kommerziell	BioLegend, eBioscience
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	Allman et al., 1992
CD45R (B220)	RA3-6B2	kommerziell	eBioscience
CD62L	MEL-14	Hybridom	ATCC: HB-132
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
CD90.2 (Thy-1.1)	53-2.1	kommerziell	BD Biosciences
CD185 (CXCR5)	2G8	kommerziell	BD Biosciences
CD197 (CCR7)	4B12	kommerziell	eBioscience
CD278 (ICOS)	MIC-280	Hybridom	Löhning et al., 2003
CD278 (ICOS)	MIC-2043	Hybridom	Burmeister et al., 2008
CD279 (PD-1)	J43 oder RMP1-30	kommerziell	eBioscience
GC B-Zellen	GL7	Hybridom	Laszlo et al., 1993
GC B-Zellen	PNA	Hybridom	Vector Laboratories
IgD	11-26c	Hybridom	ATCC: HB-250
IgM	Bet2	Hybridom	ATCC: HB-88
Ly-6G/C (Gr-1)	RB6-8C5	Hybridom	Hestdal et al., 1991
Phosphatidylserin	Annexin V	kommerziell	BD Biosciences
TIGIT	GIGD7	kommerziell	eBioscience

Antigen	Klon	Quelle	Referenz/Hersteller
TZR-V α 2	B20.1	kommerziell	eBioscience
TZR-V β 5	MR9-4	kommerziell	BD Biosciences

ATCC: American Type Culture Collection, ECACC: European Collection of Cell Cultures

Tab. 2: In der Durchflusszytometrie verwendete Sekundärantikörper.

Antikörper	Quelle	Referenz/Hersteller
Streptavidin-APC	kommerziell	BioLegend
Streptavidin-PE-Cy7	kommerziell	BioLegend oder eBioscience
Streptavidin-PerCP	kommerziell	BioLegend
anti-Dig-A647	kommerziell	Roche
anti-human-Ig γ -Cy5	kommerziell	Jackson Immuno Research

Tab. 3: In der Histologie verwendete Antikörper.

Antikörper	Klon	Quelle	Referenz
anti-CD4-A647	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
anti-CD45.1-Bio	A20	kommerziell	eBioscience
anti-CD90.1-FITC	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
anti-IgD-A549	11-26c	Hybridom	ATCC: HB-250

4.2 Mäuse

Für die tierexperimentellen Methoden wurden verschiedene *knock-out* (KO) und transgene (tg) Mausstämme verwendet. ICOS KO (Özkaynak et al., 2001) und ICOS-L KO Mäuse (Wong et al., 2003) wurden für mindestens 10 Generationen auf C57BL/6 zurückgekreuzt. Ovalbumin (OVA)-TZR transgene OT-II Mäuse (Barnden et al., 1998) waren für mindestens zehn Generationen auf C57BL/6 zurückgekreuzt und zusätzlich mit B6.PL Mäusen (The Jackson Laboratory) gekreuzt, um adoptiv transferierte Zellen anhand des kongenen Markers Thy-1.1 in Thy-1.2⁺ Rezipiententieren verfolgen zu können (im Folgenden nur OT-II genannt). Für einige Experimente wurden OT-II Mäuse außerdem mit ICOS KO Mäusen gekreuzt (OT-II.ICOS KO). Nitrophenol (NP)-BZR transgene B1-8i Tiere (Sonoda et al., 1997) waren für mindestens zehn Generationen auf C57BL/6 zurückgekreuzt und mit C κ T Tieren, die einen *Knock-out* der κ -Kette tragen (Zou et al., 1993), sowie Ly-5.1 Tieren (The Jackson Laboratory) gekreuzt, wodurch adoptiv transferierte Zellen anhand des kongenen Markers CD45.1 in CD45.2⁺ Rezipiententieren identifiziert werden konnten (im Folgenden nur B1-8i genannt). Die B1-8i Mäuse wurden für einige Experimente zusätzlich mit ICOS-L KO Mäusen gekreuzt (B1-8i.ICOS-L KO). C57BL/6 (Wildtyp, WT) Tiere wurden ursprünglich von Charles River bezogen und selber gezüchtet. Für die Experimente wurden weibliche Tiere im Alter von acht bis zwölf

Wochen verwendet. Alle Mäuse wurden unter spezifisch-pathogen-freien (SPF) Bedingungen im Tierbereich des Bundesinstituts für Risikobewertung Berlin (BfR) gezüchtet und gehalten. Die Experimente wurden im Tierbereich des Robert Koch-Instituts Berlin (RKI) gemäß den staatlichen Richtlinien durchgeführt und waren von der lokalen Genehmigungsbehörde bewilligt.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Isolierung von murinen Zellen

Primäre Zellen wurden aus der Milz oder den Lymphknoten isoliert. Dazu wurde das Gewebe zunächst von Fett befreit und zerkleinert. Für die Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz wurde diese zuerst in PBS durch ein 212 µm Sieb gedrückt und anschließend durch ein 70 µm Sieb filtriert. Erythrozyten wurden durch 1-minütige Inkubation in ACK-Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 7,2-7,4) lysiert und die Zellsuspension anschließend erneut durch ein 70 µm Sieb filtriert. Für die Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten wurden diese in R10F⁺/β-ME-Medium durch ein 70 µm Sieb gedrückt.

Die Zellzahl der erhaltenen Einzelzellsuspensionen wurde an einem Kapillar-Durchflusszytometer (Guava[®] PCA, Merck-Millipore) bestimmt. Dazu wurden die Zellen für 3 bis 4 Minuten mit ViaCount Reagenz (2,5 µg/ml LDS-751 (Molecular Probes), 1 µg/ml Propidiumiodid (Sigma), 5 mM EDTA, 0,05 % NaN₃ in PBS, pH 7,2) inkubiert und die Anzahl der nukleären und lebenden Zellen mit der ViaCount Software (Merck-Millipore) ermittelt.

Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen zentrifugiert und anschließend in PBS, FACS-PBS, MACS-PBS oder Zellkulturmedium aufgenommen.

4.3.2 *In vitro*-Restimulation von Zellen

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung in der Durchflusszytometrie (4.5.2) wurden die Zellen ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) *in vitro* für 3 h mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) (20 ng/ml, Sigma) und Ionomycin (1 µg/ml, Sigma) in RPMI-komplett-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank restimuliert. Nach 1 h wurde Brefeldin A (5 µg/ml, Sigma) zugesetzt.

4.3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung ermöglichte sowohl eine positive als auch negative Sortierung von Zellen und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Naive T-Zellen wurden auf CD62L^{high} positiv sortiert, indem die Zellen ($2 \cdot 10^8$ Zellen/ml) zuerst mit anti-CD16/CD32-Antikörper (Klon 2.4G2, 20 µg/ml) für 5 Minuten in MACS-PBS inkubiert wurden und dann eine limitierende Menge von anti-CD62L-*MicroBeads* (Miltenyi Biotec) für weitere

15 Minuten zugesetzt wurde (CD62L^{high}-Sortierung). Die Auftrennung der *MicroBead*-markierten Zellen erfolgte über LS Säulen mithilfe eines MidiMACS Magneten (Miltenyi Biotec).

B-Zellen wurden optional vor dem adoptiven Transfer (4.4.1) durch Depletion von CD43⁺ Zellen negativ sortiert (CD43-Depletion). Dazu wurden die Zellen ($3 \cdot 10^8$ Zellen/ml) ohne anti-CD16/CD32-Antikörper mit anti-CD43-*MicroBeads* (Miltenyi Biotec) für 15 Minuten in MACS-PBS inkubiert. Die CD43⁺ Zellen wurden in einer LS Säule mit aufgesetzter 22G-Kanüle in einem MidiMACS Magneten zurückgehalten.

Die Voranreicherung von transgenen Thy-1.1⁺ T-Zellen für die durchflusszytometrische Zellsortierung (4.5.4) erfolgte analog der CD62L^{high}-Sortierung durch positive Sortierung, entweder indirekt über Thy-1.1-Bio-Antikörper (Klon OX-7) und anti-Biotin-*MicroBeads* (Miltenyi Biotec) oder direkt über anti-Thy-1.1-*Beads* (Miltenyi Biotec), wobei 2 mM EDTA dem MACS-PBS zugesetzt war. Die Konzentration der verwendeten Antikörper und *MicroBeads* wurde vor der Verwendung titriert. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde am Durchflusszytometer (4.5) überprüft.

4.3.4 CFSE-Markierung von Zellen

Um die Teilung von Zellen mittels Durchflusszytometrie (4.5) zu bestimmen, wurden Zellen vor dem adoptiven Transfer (4.4.1) mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) markiert. CFSE wird bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Aus der resultierenden Abnahme der Fluoreszenz-Intensität der markierten Zellen lässt sich somit die Anzahl der erfolgten Zellteilungen bestimmen. Für die Markierung der Zellen wurden $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml mit 5 μ M CFSE (Molecular Probes) in CFSE-Ladepuffer (PBS + 0,1 % BSA) für 10 bis 15 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert und anschließend mit CFSE-Ladepuffer gewaschen.

4.4 Tierexperimentelle Methoden

4.4.1 Adoptiver Transfer von Zellen

Für den adoptiven Transfer wurden Milzzellen aus OT-II bzw. B1-8i Tieren isoliert und mithilfe von MACS auf CD62L^{high} positiv sortiert (OT-II) bzw. – wenn angegeben – CD43⁺-Zellen depletiert (B1-8i) (4.3.3). Die Frequenz der Antigen-spezifischen OT-II Zellen (B220⁻ CD4⁺ Thy-1.1⁺ TZR-V α 2⁺ TZR-V β 5⁺) sowie der Antigen-spezifischen folliculären B1-8i Zellen (B220⁺ Ac146⁺ CD21⁺ CD23⁺) wurde mittels Durchflusszytometrie (4.5) bestimmt. Soweit nicht anders angegeben, wurden entweder $2,5 \cdot 10^6$ OT-II Zellen (T-Zelltransfersystem) oder für das T-/B-Kooperationssystem $0,25 \cdot 10^6$ OT-II Zellen und $1 \cdot 10^6$ B1-8i Zellen i.v. (intravenös) in syngene Rezipiententiere transferiert. Die Rezipiententiere wurden 18 bis 24 h nach dem adoptiven Transfer immunisiert.

4.4.2 Immunisierung von Tieren

Mäuse wurden entweder mit 50 µg Alum-präzipitiertem NP-gekoppeltem OVA (NP-OVA/Alum) und $\sim 7,7 \times 10^7$ Hitze-inaktivierten *Bordetella pertussis* (*B. pert.*, Chiron Behring) oder mit 50 µg NP-OVA und CFA (komplettes Freund's Adjuvanz, *Freund's Adjuvant complete*, Sigma) als Adjuvanz s.c. (subkutan) am Schwanzansatz immunisiert. Zum Ansetzen der CFA-Emulsion wurde eine 1:1-Mischung aus NP-OVA in PBS und CFA zunächst gevortext und dann mittels Ultraschall (Ultraschallgerät Branson Sonic Power Co.) vermischt.

4.4.3 *In vivo*-Blockaden mit Antikörpern

Um die Signaltransduktion über ICOS *in vivo* zu blockieren, wurden 150 µg eines blockierenden anti-ICOS-L-Antikörpers (Klon MIL-5733, Ratten IgG2a, Frey et al., 2010) oder einer Isotyp-Kontrolle (Klon 1D10, Ratten IgG2a) i.p. (intraperitoneal) injiziert. Der Endotoxin-Gehalt betrug weniger als 0,5 EU (Endotoxin-Einheiten, 1 EU = 100 pg Endotoxin) pro mg Protein. Für ICOS-L Blockaden zu späten Zeitpunkten wurden die Antikörper an Tag 6, 7, 9 und 11 appliziert.

4.5 Durchflusszytometrie

4.5.1 Oberflächenfärbung

Die Färbung von Antigenen auf der Zelloberfläche wurde mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern (siehe Tab. 1) in 96-well-Rundbodenplatten durchgeführt. Dazu wurden $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml zunächst für 5 Minuten mit anti-CD16/CD32-Antikörper (Klon 2.4G2, 20 µg/ml) in FACS-PBS auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Fluoreszenzfarbstoff-markierten oder Hapten-markierten Primärantikörper für weitere 20 bis 30 Minuten zugegeben. Bei Verwendung von Hapten-markierten Primärantikörpern (biotinyliert oder Dig-gekoppelt) wurde nach dem Waschen der Zellen erneut für 5 Minuten mit anti-CD16/CD32-Antikörper inkubiert und dann für die Sekundärfärbung Fluoreszenzfarbstoff-markiertes Streptavidin bzw. anti-Dig-Antikörper für 5 bzw. 20 Minuten hinzugefügt. Die Färbung von CXCR5 erfolgte mit einem biotinylierten-Antikörper für 1 h ($10 \cdot 10^7$ Zellen/ml), wobei die weiteren Antikörper in dem gleichen Volumen für die letzten 20 Minuten zugesetzt wurden ($5 \cdot 10^7$ Zellen/ml) und für die Sekundärfärbung Streptavidin-PE-Cy7 verwendet wurde. Die Färbung von CCR7 erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C. Zum Ausschluss von toten Zellen aus der Analyse wurden die gefärbten Zellen direkt vor der Messung mit DAPI (4',6-Diamino-2-Phylindol) (0,33 µM, Roche) versetzt und am BD LSR II Durchflusszytometer oder BD FACSAria II Zellsortierer (BD Biosciences) mit der BD FACSDiVa™ Software (BD Biosciences) aufgenommen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo (Tree Star) und ist in Abb. 4 exemplarisch dargestellt. Die erhaltenen Daten wurden entweder als Histogramm oder *Dot Plot* dargestellt, wobei die Zahlen in den *Plots* den prozentualen Anteil der Zellen in dem jeweils vorangehenden *Gate* angeben.

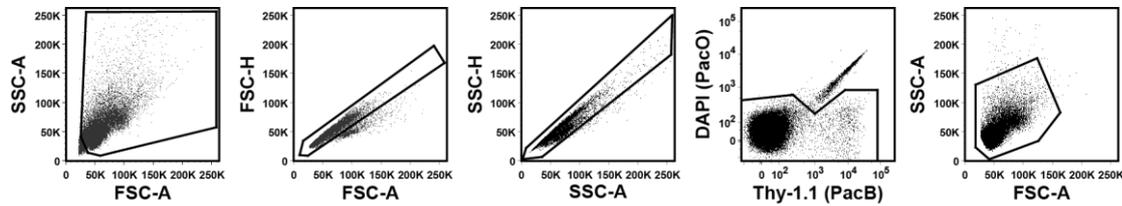


Abb. 4: Gating-Strategie für durchflusszytometrische Daten.

Zuerst wurde aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Zellen (Größe (FSC: *forward scatter*) und Granularität (SSC: *sideward scatter*)) ein großes *Scatter Gate* (FSC gegen SSC) gesetzt, das Zelltrümmer ausschließt. Nachfolgend wurden Zelldoubletten anhand der FSC- und SSC-Signale (A: Fläche, H: Höhe) sowie tote DAPI⁺ Zellen aus der Analyse ausgeschlossen (lebend *Gate*) und ein kleines *Scatter Gate* gesetzt.

4.5.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Analyse der Zytokin-Expression wurden die Zellen zunächst mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A *in vitro* restimuliert (4.3.2) und anschließend die Oberflächenfärbung durchgeführt (4.5.1). Um tote Zellen zu markieren, wurden die Zellen mit Pacific Orange Succinimidyl-Ester (1,34 µg/ml, Invitrogen) für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 2 % Formaldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Alle weiteren Färbe- und Waschschriffe wurden in Saponin-Puffer (0,5 % Saponin (Sigma) in FACS-PBS) durchgeführt. Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen mit anti-CD16/CD32-Antikörper (Klon 2.4G2, 100 µg/ml) und Ratten-Immunglobulin (50 µg/ml, Dianova) blockiert und dann die Zellen mit den Primärantikörpern für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sekundärfärbung erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Färbung von IL-21 erfolgte mit Maus IL-21R-Fc-Chimera (R&D Systems) und mit Ziege anti-human-Igγ-Cy5 als Sekundärantikörper.

Die Färbung von BCL-6 wurde nach der Oberflächenfärbung (4.5.1) und Markierung von toten Zellen mit Pacific Orange (s.o.) unter Verwendung des Foxp3 *Staining Buffer Set* (eBioscience) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde für 1 h fixiert und die Färbung von BCL-6 für 30 Minuten durchgeführt.

4.5.3 Nachweis von Apoptose

Früh-apoptotische Zellen wurden in der Durchflusszytometrie nachgewiesen, indem Phosphatidylserin auf der Oberfläche von früh-apoptotischen Zellen mit Annexin V gefärbt wurde. Die Annexin V-Färbung wurde im Anschluss an die Oberflächenfärbung (4.5.1) durchgeführt und erfolgte in Anwesenheit von anti-CD16/CD32-Antikörper (Klon 2.4G2, 20 µg/ml) mit Annexin V-Cy5 in

Annexin V-Bindpuffer (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 0,1 % NaN₃) für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Alternativ wurden apoptotische Zellen durch Markierung von aktiven Caspasen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Caspase-Inhibitoren (FLICA, *fluorochrome inhibitor of caspases*) nachgewiesen. Die aktiven Caspasen-1 und -3 bis -9 wurden mit dem *Poly Caspases FLICA reagent* (FAM-VAD-FMK) unter Verwendung des *Apoptosis Detection Kit Caspase Assay* (AbD Serotec) gefärbt. Dabei wurden abweichend von den Angaben des Herstellers 5·10⁶ Zellen in 240 µl mit dem FLICA-Reagenz in R10F⁺/β-ME gefärbt. Die Oberflächenfärbung weiterer Antigene erfolgte anschließend.

Abweichend zur allgemeinen Auswertung der durchflusszytometrischen Daten (4.5.1 und Abb. 4) wurden DAPI^{int} Annexin V^{high} bzw. DAPI^{int} FLICA^{high} Zellen in die Analyse mit einbezogen (Abb. 5).

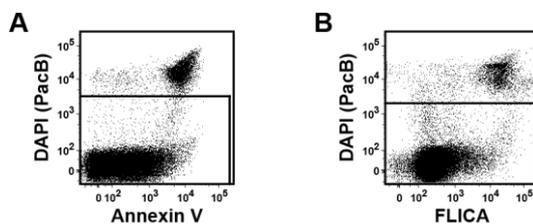


Abb. 5: Gating-Strategie für apoptotische Zellen.

In dem lebend Gate werden DAPI^{int} Annexin V^{high} Zellen (A) bzw. DAPI^{int} FLICA^{high} Zellen (B) mit einbezogen.

4.5.4 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Um sehr kleine Zellpopulationen mit einer sehr hohen Reinheit zu gewinnen, wurden die Zellen zunächst über MACS vorangereichert und dann durchflusszytometrisch sortiert. Für die Sortierung von transgenen Thy-1.1⁺ T-Zellen sowie transgenen Thy-1.1⁺ T_{FH}⁻ (CXCR5^{high} PD-1^{high}) bzw. nicht-T_{FH}⁻ Zellen (CXCR5⁻ PD-1⁻) wurden Thy-1.1⁺ Zellen über Thy-1.1 durch MACS vorangereichert (4.3.3). Für die Sortierung von transgenen Thy-1.1⁺ T-Zellen wurden die Zellen entsprechend 4.5.1 mit folgenden Antikörpern in MACS-PBS inkubiert: CD4-FITC, Thy-1.1-Cy5 und B220-PacB. Bei der indirekten MACS-Sortierung über Thy-1.1-Bio-Antikörper und anti-Biotin-*MicroBeads* wurde in der Primärfärbung Thy-1.1-Cy5 nicht verwendet, und es folgte eine Sekundärfärbung mit Streptavidin-APC. Für die Sortierung von transgenen Thy-1.1⁺ T_{FH}⁻ und nicht-T_{FH}⁻ Zellen wurden folgende Antikörper verwendet: PD-1-FITC (Klon J43), CXCR5-Bio, Thy-1.1-Cy5, CD4-APC-Cy7 (Klon RM4-5) und B220-PacB, gefolgt von einer Sekundärfärbung mit Streptavidin-PE-Cy7. Tote Zellen wurden durch Zugabe von DAPI (1,25 µM) direkt vor der Sortierung markiert. Die durchflusszytometrische Sortierung der Zellen erfolgte am BD FACSAria II Zellsortierer (BD Biosciences) mit BD FACSDiVaTM Software (BD Biosciences) im *4-way purity* Modus mit einer 85 µm-Nozzle.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Präparation von Gesamt-RNA aus primären Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA (Ribonukleinsäure) aus primären Zellen erfolgte entweder mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) oder dem *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Bei Verwendung des Roche-Kits wurden die Zellen in DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem PBS aufgenommen, dann mit Lysis-Puffer versetzt, gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei Benutzung des Qiagen-Kits wurden die Zellen in mit β -ME-versetztem RLT-Puffer aufgenommen. In beiden Fällen wurden die lysierten Zellen bis zur Präparation der RNA bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Präparation der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers und die isolierte RNA wurde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop ND-1000 Spektrometer (NanoDrop Technologies) bestimmt. Die Integrität der isolierten RNA wurde mithilfe des RNA 6000 Nano Kits oder RNA 6000 Pico Kits (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers am 2100 Bioanalyzer mit der 2100 Expert Software (Agilent Technologies) überprüft.

4.6.2 Microarray-Analyse

Für die Analyse der Expressionsniveau von über 39.000 unterschiedlichen mRNA-Transkripten wurde das *GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array* (Affymetrix) verwendet. Dafür wurde RNA mit einem Integritäts-Index von mindestens 8,1 eingesetzt. Die Durchführung der Arrays erfolgte freundlicherweise durch Heidi Schliemann (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, DRFZ). Je Probe wurde ein Chip verwendet.

Die Auswertung der Microarray-Daten wurde freundlicherweise von Joachim Grün (DRFZ) unter Verwendung der Bioretis-Datenbasis (<http://www.bioretis-analysis.de>) übernommen. Die Standardeinstellungen (*default settings*) für die Auswertung umfassten einerseits einen Grenzwert für die Genexpression (Signal von 37,5), der bei Erreichen die Zuordnung eines *present call* oder *marginal call* für jedes Gen erlaubte. Außerdem wurden für jedes Gen sogenannte *increase* bzw. *decrease change calls* angegeben, die auf einer positiven bzw. negativen Veränderung des Signals bei einem Chip-versus-Chip-Vergleich (d.h. bei dem Vergleich unterschiedlicher Proben) beruhten. Ein Gen wurde als signifikant differentiell reguliert definiert, wenn für dieses Gen bei dem paarweisen Vergleich von den Signalen auf den Chips der einen experimentellen Gruppe mit denen der jeweils anderen experimentellen Gruppe mindestens ein 50 % *increase* oder *decrease change call* erhalten wurde. Hier bedeutet dies, dass bei jeweils 2 Chips pro Gruppe mindestens 3 von 4 Vergleichen einen *change call* ergeben mussten, d.h. $> 75\%$ *increase* oder *decrease change call* (Menßen et al., 2009). Desweiteren erlaubte die Datenbasis für jedes Gen die Berechnung der n-fachen Regulation (*fold change*, FC) und des HPCDA-Score (*high-performance chip data analysis*), der die Relevanz der differentiellen Veränderung angab (Joachim Grün, nicht veröffentlicht).

4.6.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden 640 ng RNA in einem Reaktionsvolumen von 40 µl im 2720 Thermo Cycler (Applied Biosystems) revers transkribiert (10 Minuten bei 25 °C, 120 Minuten bei 37 °C, 5 Minuten bei 85 °C). Um eine Kontamination der RNA-Proben durch genomische DNA auszuschließen, die in der folgenden *realtime*-RT-PCR (Polymerase Kettenreaktion) (4.6.4) ein falsches Signal geben würde, wurden 100 ng RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl als -RT-Kontrolle ohne die Reverse Transkriptase inkubiert, so dass die RNA nicht in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

4.6.4 Quantitative *realtime*-RT-PCR

Die *realtime*-PCR erlaubt die Quantifizierung von DNA und somit die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene. Dazu wurde die RNA zunächst in cDNA revers transkribiert (4.6.3) und die cDNA mithilfe von TaqMan[®]-Sonden in der *realtime*-PCR quantifiziert. Es wurden *TaqMan[®] Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) (siehe Tab. 4), die für die untersuchten Gene jeweils spezifische Primer und Sonden enthielten, oder für das Haushalt-Gen *β2m* eigene Primer und eine eigene Sonde verwendet (siehe Tab. 5). Alle PCR-Produkte (Ausnahme *Maf*) überspannen die Exon-Exon-Grenze und detektieren somit spezifisch cDNA und nicht genomische DNA. Für *Maf* wurde in der *realtime*-PCR zusätzlich cDNA aus der -RT-Kontrolle (siehe 4.6.3) eingesetzt, um eine Verunreinigung der RNA durch genomische DNA auszuschließen.

Jeder Ansatz der *realtime*-PCR enthielt 10 µl Absolute Blue QPCR LoX ROX Mix (2x) (Thermo Scientific), 1 µl *TaqMan[®] Gene Expression Assay* (20x) (Applied Biosystems), 2 µl cDNA (10 ng) und 7 µl H₂O bzw. 10 µl Absolute Blue QPCR LoX ROX Mix (2x) (Thermo Scientific), 0,6 µl Reverse Primer, 0,6 µl Forward Primer, 0,3 µl Sonde, 2 µl cDNA (10 ng) und 6,5 µl H₂O in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Messung der Proben erfolgte als Triplikate auf 96-well-Platten im ABI 7500 (Applied Biosystems). Als interner Standard wurden für jede Probe die Haushalt-Gene *Hprt1* und *β2m* amplifiziert.

Zyklus-Parameter der *realtime*-PCR:

1. 95 °C für 15 Minuten (Enzymaktivierung)
2. 40 Zyklen
 - a. 95 °C für 15 sec (Denaturierung)
 - b. 60 °C für 60 sec (Hybridisierung und Elongation)
3. 4 °C

Die Auswertung der *realtime*-PCR Daten erfolgte mit der zugehörigen 7500 Software (Version 2.0.5). In den Datensätzen wurde durch Festlegen der *threshold position* der *threshold cycle* (Ct-Wert) bestimmt. Die weitere Auswertung der Daten wurde mit der DataAssist Software (Version 3.01,

Applied Biosystems) durchgeführt. Die n-fache Regulation (*fold change*, FC) eines Gens wurde dabei mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001), die auf der Annahme beruht, dass sich das PCR-Produkt bei jedem Zyklus verdoppelt. Zuerst wurde für jede Probe aus den Triplikaten der Mittelwert des Ct-Wertes des untersuchten Gens oder der beiden Haushalt-Gene berechnet. Dann wurde das Expressionsniveau des Gens von Interesse (GOI, *gene of interest*) mit dem Expressionsniveau der Haushalt-Gene (HKG, *housekeeping gene*) in jeder Probe normalisiert: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{GOI}) - \text{Ct}(\text{Mittelwert HKG})$. Anschließend wurde die n-fache Regulation (FC) mit folgender Formel berechnet: $\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, wobei $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{Exp.}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle})$. (Exp.: experimentelle Bedingung: ICOS-L KO, anti-ICOS-L-Antikörper bzw. T_{FH} -Zellen, Kontrolle: WT, Kontroll-Antikörper bzw. nicht- T_{FH} -Zellen).

Heatmaps und Cluster-Analysen wurden ebenfalls mit der DataAssist Software (Version 3.01, Applied Biosystems) erstellt. Für die Abstandsmessung wurde die Pearson's Korrelation und für die Clustering-Methode die *average linkage* gewählt. Die Expressionstärke jedes Gens ist im *global view* Modus dargestellt.

Tab. 4: Verwendete TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)

Gensymbol	Gename	Assay ID	Produktlänge [bp]	GenBank Accession Nr.
<i>Bach2</i>	BTB and CNC homology 2	Mm00464379_m1	81	NM_001109661.1
<i>Batf</i>	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	Mm00479410_m1	79	NM_016767.2
<i>Bcl2l11</i>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator), Bim	Mm00437796_m	64	NM_009754.3 NM_207680.2 NM_207681.2
<i>FoxP1</i>	forkhead box 1	Mm00474848_m1	69	NM_001197321.1 NM_001197322.1 NM_053202.2
<i>Hprt</i>	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, Hprt1	Mm01545399_m1	81	NM_013556.2
<i>Il21</i>	interleukin-21	Mm00517640_m1	67	NM_021782.2
<i>Ipmk</i>	inositol polyphosphate multikinase	Mm01148668_m1	73	NM_027184.1
<i>Klf2</i>	Kruppel-like factor 2 (lung)	Mm01244979_g1	58	NM_008452.2
<i>Maf</i>	avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog, c-Maf	Mm02581355_s1	154	NM_001025577.2
<i>Nfatc1</i>	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	Mm00479445_m1	75	NM_001164109.1 NM_001164110.1 NM_001164111.1 NM_001164112.1 NM_016791.4 NM_198429.2

Gensymbol	Genname	Assay ID	Produktlänge [bp]	GenBank Accession Nr.
<i>Pel1</i>	pellino1	Mm00481051_m1	74	NM_023324.2
<i>Prdm1</i>	Blimp-1, PR domain containing 1, with ZNF domain	Mm00476128_m1	72	NM_007548.3
<i>Stat5b</i>	signal transducer and activator of transcription 5B	Mm00839889_m1	92	NM_001113563.1 NM_011489.3
<i>Tnfrsf11</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11, Trance, RANKL	Mm00441906_m1	66	NM_011613.3

Die *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* enthalten jeweils *forward* (vorwärts) und *reverse* (rückwärts) Primer sowie eine sequenz-spezifische *TaqMan*[®]-Sonde. Die Sonden enthalten als Fluoreszenz-Farbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) und als Quencher NFQ-MGB (NFQ: nicht-fluoreszierender Quencher, MGB: *minor groove binder*). Alle *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (Ausnahme *Maf*) überspannen eine Exon-Exon-Grenze.

Tab. 5: Primer- und Sonden-Sequenz für $\beta 2m$ in der *TaqMan*[®]-PCR

Gen-symbol	Genname	Primer / Sonde	DNA-Sequenz	Produktlänge [bp]	GenBank Accession Nr.
<i>b2m</i>	beta-2 microglobulin	$\beta 2m_forward$	ATTCACCCCACTGAGACTGA	86	NC_000068.6
		$\beta 2m_reverse$	CTCGATCCCAGTAGACGGTC		
		$\beta 2m_probe$	FAM-TGCAGAGTTAAGCATGCCAG TATGGCCG-TAMRA		

Die Primer und die Sonde wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Die Sonde enthält als Fluoreszenzfarbstoff FAM und als Quencher TAMRA. Die Sequenz ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Das PCR-Produkt überspannt eine Exon-Exon-Grenze.

4.7 Histologische Methoden

4.7.1 Einfrieren von Gewebe und Anfertigung von Kryoschnitten

Das Gewebe wurde von Fett befreit und in Tissue-Tek OCT Compound (Sakura) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Gewebe bei -70 °C gelagert.

Am Kryotom (Leica CM 1950) wurden 8 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt, auf sialinierte Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten in Aceton bei Raumtemperatur fixiert, für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

4.7.2 Immunfluoreszenz

Die Kryoschnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut, für 10 Minuten in Aceton erneut fixiert und für 15 Minuten getrocknet. Um endogene Oxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte für

1 h bei 37 °C in Peroxidase-Block-Lösung (PBS + 1 mM NaN₃ + 10 mM Glukose (Sigma) + 1 U/ml Glukose-Oxidase (Sigma)) inkubiert und anschließend 3 Mal für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur und die Waschschrirte in einer Kuvette, wobei jeweils 2 Mal für 5 Minuten in Waschpuffer (0,05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) in PBS) und 1 Mal für 5 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gewaschen wurde. Nach der Blockade mit 0,5x Casein (Vector Laboratories) für 1 h wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern in 0,5x Casein für 1 h inkubiert und anschließend gewaschen. Als Primärantikörper wurden entweder direkt Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper oder biotinylierte Antikörper verwendet. Schwache Signale wurden mithilfe des Tyramid-Signalamplifikations-Kits (*tyramide signaling amplification*, TSA Detection Kit #22 bzw. #42, Invitrogen – Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers verstärkt. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 1 h mit einem POD (Peroxidase)-gekoppeltem Sekundärantikörper (anti-FITC-POD (Roche) oder Streptavidin-POD (Jackson ImmunoResearch)) in 0,5x Casein inkubiert, gewaschen und dann für 10 Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Tyramid-Reagenz (Alexa Fluor 555-Tyramid oder Alexa Fluor 488-Tyramid) inkubiert und gewaschen. Wenn die Färbung eines zweiten Antigens ebenfalls über das Tyramid-Signalamplifikations-System verstärkt wurde, wurden erneut endogene Peroxidasen mit Peroxidase-Block-Lösung blockiert, mit dem entsprechenden POD-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und die Tyramid-Amplifikation durchgeführt. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (100 ng/ml) für 10 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte 1 Mal für 5 Minuten in PBS gewaschen und mit Fluoromount (Sigma) eingedeckelt. Fluoreszenzbilder der gefärbten Gewebeschnitte wurden am LSM 710 Laser Scanning Mikroskop (Carl Zeiss) mit der Software ZEN (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen und bearbeitet.

4.8 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. In den dargestellten Graphen repräsentiert jedes Symbol ein Tier. Soweit nicht anders angegeben, ist der Median für eine Gruppe abgebildet und für die Berechnung der statistischen Signifikanz eines Unterschiedes zwischen verschiedenen Gruppen der Mann-Whitney U-Test verwendet worden. Stamnte ein Messpunkt-Paar der zu vergleichenden Gruppen aus demselben Tier, wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben verwendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet und mit * gekennzeichnet, ein p-Wert < 0,01 mit ** und ein p-Wert < 0,001 mit ***.

5 Ergebnisse

5.1 Das adoptive Transfersystem

5.1.1 Das adoptive T-/B-Kooperationssystem

Das in dieser Arbeit verwendete adoptive Transfersystem zur Untersuchung der T-/B-Zellinteraktion wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Dahler, 2009). Das T-/B-Kooperationssystem beruht auf dem adoptiven Transfer von OVA-TZR transgenen T-Zellen aus OT-II Tieren und NP-BZR transgenen B-Zellen aus B1-8i Tieren in syngene Rezipiententiere und ermöglicht Untersuchungen auf Einzelzellebene *in vivo*. Zur Immunisierung wird NP gekoppelt an OVA als Antigen verwendet, so dass sowohl die transgenen T- als auch B-Zellen für dasselbe Antigen spezifisch sind. Die transgenen B-Zellen können über ihren NP-spezifischen BZR das Antigen erkennen, aufnehmen und prozessieren. Anschließend können die transgenen B-Zellen die prozessierten OVA-Peptide über ihren MHCII-Komplex den transgenen OVA-spezifischen T-Zellen präsentieren, die daraufhin ihrerseits aktiviert werden (Abb. 6 A).

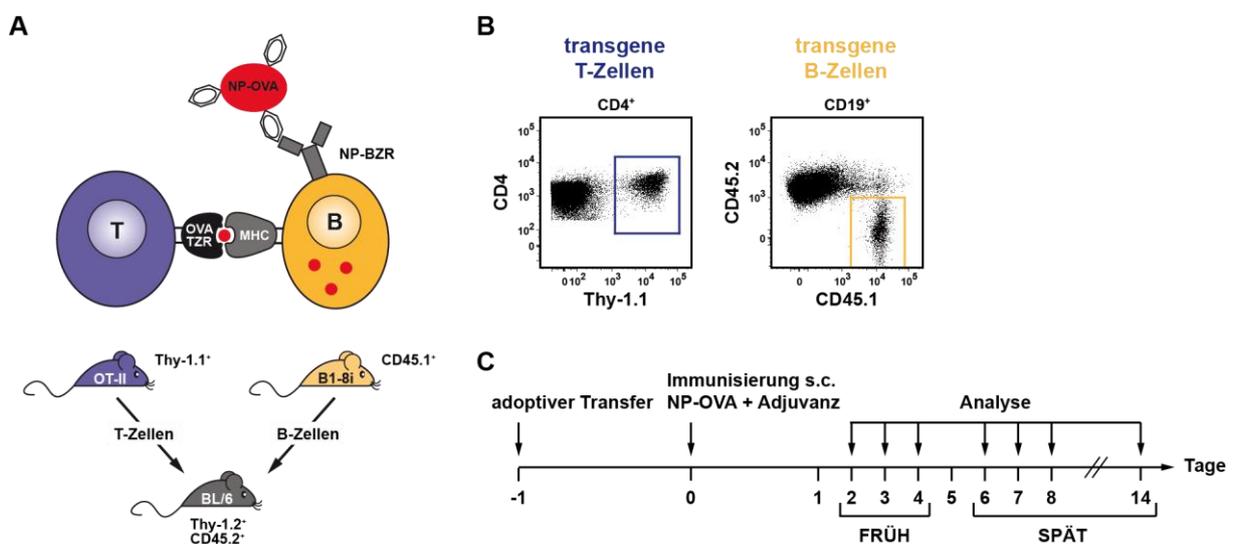


Abb. 6: Das adoptive T-/B-Kooperationssystem.

A) OVA-spezifische OT-II T-Zellen und NP-spezifische B1-8i B-Zellen sind über die kongenen Marker Thy-1.1 bzw. CD45.1 markiert und werden in syngene Thy-1.2⁺, CD45.2⁺ Rezipiententiere transferiert. Die transgenen T- und B-Zellen können nach Immunisierung mit dem Antigen NP-OVA miteinander interagieren. B) Identifizierung der transgenen T- und B-Zellen anhand der kongenen Marker Thy-1.1 bzw. CD45.1 in der Durchflusszytometrie. C) Zeitlicher Ablauf des adoptiven Zelltransfers, Immunisierung und Analyse.

Die transferierten Antigen-spezifischen T- und B-Zellen können sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Histologie anhand der Expression des kongenen Markers Thy-1.1 bzw. CD45.1 von den Zellen des Rezipiententieres unterschieden werden, die Thy-1.2 und CD45.2 exprimieren (Abb. 6 B). Naive (CD62L^{high} sortierte) transgene T-Zellen (Thy-1.1⁺) und transgene B-Zellen (CD45.1⁺) wurden an Tag -1 adoptiv transferiert. Am darauf folgenden Tag (Tag 0) wurde die

Immunisierung s.c. entweder mit NP-OVA/Alum plus *B. pert.* oder NP-OVA plus CFA als Antigen plus Adjuvanz durchgeführt. In Experimenten zur Analyse von T_{FH}-Zellen wurde CFA als Adjuvanz eingesetzt, da in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass bei Verwendung dieses Adjuvanzes eine vermehrte Generierung von T_{FH}-Zellen stattfand. An den angegebenen Tagen nach der Immunisierung konnten die transgenen T- und B-Zellen in den drainierenden Lymphknoten analysiert werden; dabei wurde zwischen frühen (Tag 2 bis 4) und späten (Tag 6 bis 14) Zeitpunkten unterschieden (Abb. 6 C).

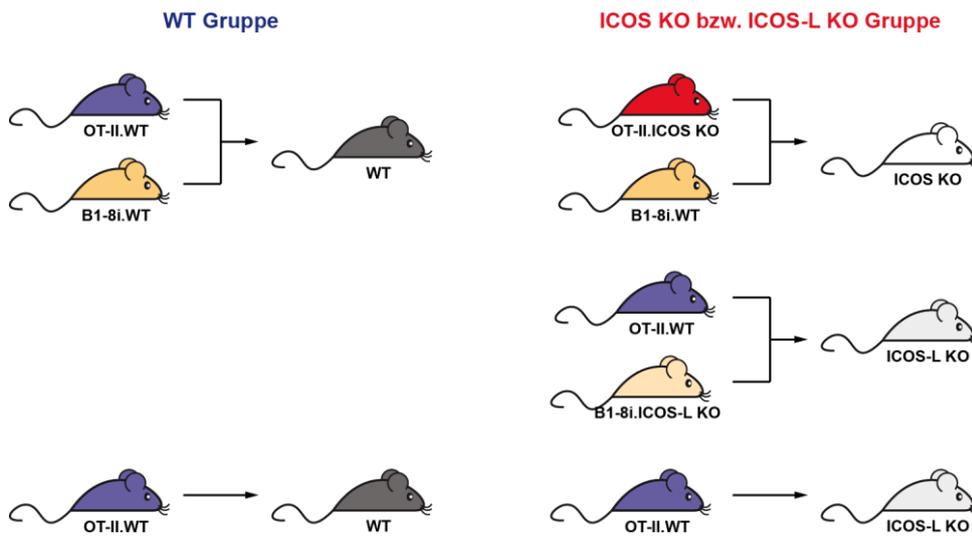


Abb. 7: WT und ICOS KO bzw. ICOS-L KO Gruppe im adoptiven Transfersystem.

WT Gruppe: ICOS und ICOS-L werden von den transgenen und endogenen Zellen exprimiert und können miteinander interagieren. ICOS KO bzw. ICOS-L KO Gruppe: ICOS-Kostimulation der transgenen T-Zellen ist nicht möglich, da entweder ICOS von den transgenen T-Zellen oder ICOS-L von den transgenen B-Zellen sowie endogenen B-Zellen und DZ nicht exprimiert wird.

Um die Rolle von ICOS für die T-/B-Kooperation zu untersuchen, wurden zwei experimentelle Gruppen eingeführt, in denen eine Signaltransduktion über ICOS entweder möglich oder nicht möglich ist. Da ICOS und ICOS-L als Rezeptor-Liganden-Paar keine weiteren Liganden bzw. Rezeptoren besitzen (Mak et al., 2003; Nurieva et al., 2003b; Wong et al., 2003), kann die ICOS-ICOS-L-Interaktion unterbunden werden, indem entweder ICOS auf T-Zellen oder ICOS-L auf B-Zellen und DZ fehlt. Im Allgemeinen können für die beiden Gruppen entweder nur transgene T-Zellen (reiner T-Zelltransfer) oder transgene T- und B-Zellen (T-/B-Kooperationssystem) transferiert werden. In der WT Gruppe werden ICOS und ICOS-L exprimiert, und eine Interaktion zwischen ICOS auf T-Zellen und ICOS-L auf B-Zellen und DZ kann stattfinden. In der ICOS KO bzw. ICOS-L KO Gruppe können ICOS und ICOS-L nicht miteinander interagieren, da entweder 1) sowohl die transferierten transgenen T-Zellen als auch die endogenen T-Zellen im Rezipienten ICOS nicht exprimieren (Transfer von OT-II.ICOS KO T-Zellen und B1-8i B-Zellen in ICOS KO Rezipienten), 2) sowohl die transferierten transgenen B-Zellen als auch die endogenen B-Zellen und DZ im Rezipienten ICOS-L nicht exprimieren (Transfer von OT-II.WT T-Zellen und

B1-8i.ICOS-L KO B-Zellen in ICOS-L KO Rezipienten) oder 3) die endogenen B-Zellen und DZ im Rezipienten ICOS-L nicht exprimieren (Transfer von OT-II.WT T-Zellen in ICOS-L KO Rezipienten) (Abb. 7).

5.1.2 Bisherige Ergebnisse aus dem T-Zelltransfersystem und dem T-/B-Kooperationssystem

Aus Experimenten, die im Vorfeld dieser Arbeit im T-Zelltransfersystem bzw. T-/B-Kooperationssystem durchgeführt wurden, war bekannt, dass in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation sowohl die Antigen-spezifischen transgenen T-Zellen als auch B-Zellen eine geringere Expansion aufwiesen (Burmeister, 2009) bzw. (Dahler, 2009). Weiterhin zeigten die transgenen T-Zellen einen Defekt in der Differenzierung zu T_{FH}-Zellen (Burmeister, 2009), wie es bereits für ICOS KO und ICOS-L KO Tiere nach Immunisierung beschrieben wurde (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006). Die transgenen B-Zellen zeigten einen Defekt in der Ausbildung von GC B-Zellen sowie klassengewechselten B-Zellen (Dahler, 2009).

5.2 Optimierung des T-/B-Kooperationssystems und Vergleich mit dem T-Zelltransfersystem

Das bis zu dem Beginn dieser Arbeit verwendete T-/B-Kooperationssystem basierte auf dem Transfer von $2 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und $2,5 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen. Ein Nachteil und auch Kritikpunkt an diesem System waren sowohl die sehr frühe Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen als auch die sehr frühe Ausbildung (~Tag 3) und recht rasche Auflösung (~Tag 10 bis 14) von Keimzentren (Dahler, 2009). Im Vergleich zur Ausbildung von Keimzentren in WT Mäusen nach Immunisierung (Tag 6) verläuft die Immunantwort in diesem System zu schnell ab, was als unphysiologisch betrachtet wurde. Aus diesem Grund sollte im ersten Schritt dieser Arbeit das T-/B-Kooperationssystem mit dem Ziel optimiert werden, die Anzahl der transferierten OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen so zu verändern, dass die Kinetik des T-/B-Kooperationssystems der in WT Mäusen ähnelt und somit eine physiologischere Immunantwort widerspiegelt.

5.2.1 Höhere Proliferation und bessere Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen bei adoptivem Transfer von geringeren Zellzahlen

Zunächst wurde untersucht, wie sich der adoptive Transfer einer geringeren Anzahl von transgenen T- und B-Zellen auf die Expansions- und Aktivierungskinetik auswirkte, wobei das Verhältnis von T- zu B-Zellen zunächst bei 1:1 belassen wurde. Dazu wurden jeweils $2 \cdot 10^6$, $0,5 \cdot 10^6$ oder $0,125 \cdot 10^6$ OT-II und B1-8i Zellen transferiert.

Es zeigte sich, dass die transgenen T- und B-Zellen in geringeren absoluten Zellzahlen vorlagen und das Maximum der Expansion, insbesondere bei den B-Zellen, zu einem späteren Zeitpunkt hin

verschoben war, wenn weniger Zellen transferiert wurden (Abb. 8 A & B). Zudem konnte anhand des CFSE-Profiles der transferierten Zellen nachgewiesen werden, dass bei weniger transferierten Zellen die transgenen T- und B-Zellen besser proliferierten, d.h. ein höherer Anteil der Zellen in einer höheren Generation vorlag (Abb. 8 C & D). An Tag 10 waren bei dem Transfer von je $2 \cdot 10^6$ bzw. $0,5 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen besonders bei den transgenen T-Zellen noch sehr viele transferierte Zellen ungeteilt (Daten nicht gezeigt). Auch die Berechnung der relativen Expansion der transferierten T- und B-Zellen (Verhältnis der absoluten Zellzahl zum analysierten Zeitpunkt zu der Anzahl der transferierten Zellen) verdeutlichte die stärkere Expansion bei weniger transferierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivierungskinetik der transgenen T-Zellen zeigte in Bezug auf die untersuchten Marker ICOS und CD62L keine Veränderung bei Variation der transferierten Zellzahl (Daten nicht gezeigt). Jedoch wurden die transgenen T-Zellen umso besser aktiviert, d.h. sie wiesen zu allen untersuchten Zeitpunkten einen höheren MFI (mittlere Fluoreszenz-Intensität) für ICOS und einen höheren Anteil an CD62L^{low} Zellen auf, je weniger Zellen transferiert wurden (Abb. 8 E und Daten nicht gezeigt). Bei dem Transfer von geringeren Zellzahlen war für die transgenen B-Zellen hingegen die Kinetik in der Aktivierung leicht zu späteren Zeitpunkten hin verschoben (Daten nicht gezeigt). Zudem war der Anteil der transgenen klassengewechselten (IgM⁻ IgD⁻) B-Zellen deutlich erhöht und der Anteil der transgenen naiven (IgM⁺ IgD⁺) B-Zellen hingegen drastisch erniedrigt, was auf eine bessere Aktivierung der Zellen hindeutet (Abb. 8 F und Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig war auch der Anteil der transgenen GL7⁺ B-Zellen deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt), wobei GL7 zu späten Zeitpunkten ein Marker für GC B-Zellen darstellt (Laszlo et al., 1993; Naito et al., 2007).

Insgesamt konnten sowohl eine höhere Proliferation und Expansion als auch eine bessere Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen beobachtet werden, je weniger Zellen adoptiv transferiert wurden. Außerdem wurde das Maximum der Expansion und Aktivierung der transgenen Zellen zu späteren Zeitpunkten beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass bei dem adoptiven Transfer von je $2 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen und somit auch bei den bisher verwendeten Zellzahlen eine Übersättigung des Zelltransfersystems stattfand.

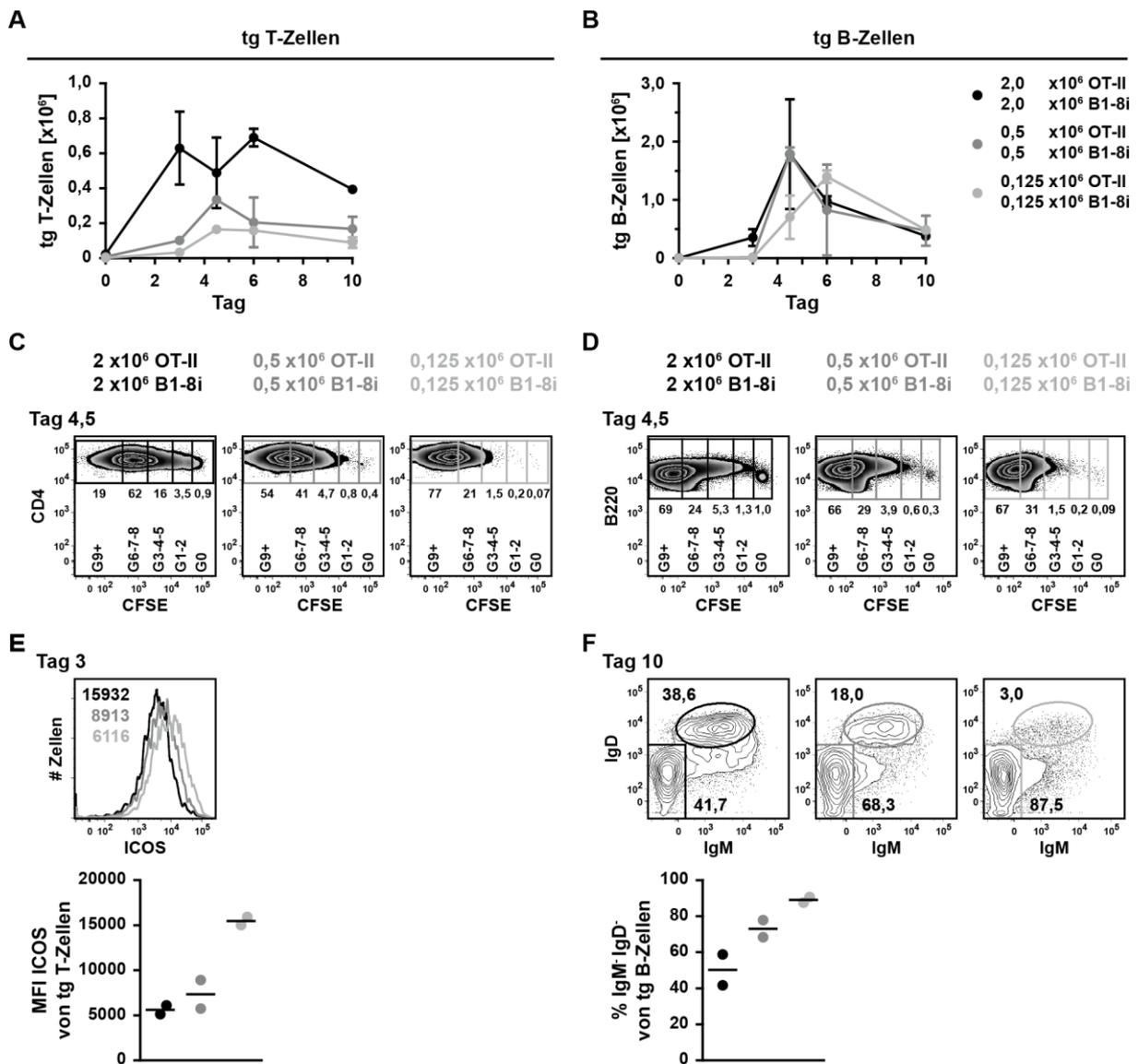


Abb. 8: Expansion und Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen.

Jeweils $2 \cdot 10^6$, $0,5 \cdot 10^6$ oder $0,125 \cdot 10^6$ CFSE-markierte OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen wurden in WT Rezipienten transferiert und diese einen Tag später mit NP-OVA/Alum plus *B. pert.* s.c. immunisiert. Transgene T- und B-Zellen der ingLN (inguinalen Lymphknoten) wurden an Tag 0, 3, 4,5, 6 und 10 in der Durchflusszytometrie analysiert und als lebend/B220/CD4⁺/Thy-1.1⁺ bzw. lebend/B Lin/B220⁺/CD45.2⁺/CD45.1⁺ definiert. A) und B) Absolute Zellzahl der transgenen T- bzw. B-Zellen, dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 2$ Tieren je Gruppe. C) und D) CFSE-Profil der transgenen T- bzw. B-Zellen, gezeigt ist ein repräsentativer Plot für Tag 4,5 mit Angabe der prozentualen Anteile in der jeweiligen Generation (G). E) Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) für ICOS auf den transgenen T-Zellen an Tag 3. Die Zahlen im Plot geben den MFI an. F) Transgene naive (IgM⁺ IgD⁺) und klassengewechselte (IgM⁻ IgD⁻) B-Zellen an Tag 10.

5.2.2 Beschleunigte Expansions- und Aktivierungskinetik der transgenen B-Zellen bei Kotransfer von transgenen T-Zellen

Das bisher verwendete T/B-Kooperationssystem mit $2 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und $2,5 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen zeigte auch im Vergleich zu dem reinen B-Zelltransfersystem der Arbeitsgruppe von Anja Hauser (DRFZ) mit $2 \cdot 10^6$ transferierten B1-8i B-Zellen eine beschleunigte Kinetik. Um zu überprüfen,

ob allein der zusätzliche Transfer von transgenen T-Zellen zum B-Zelltransfer und nicht die insgesamt hohe transferierte Zellzahl im bisherigen T-/B-Kooperationssystem den schnellen Ablauf der Immunreaktion bewirkte, wurde die Anzahl der kotransferierten transgenen T-Zellen titriert. Für die Analyse wurden jeweils $2 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen zusammen mit $2 \cdot 10^6$, $0,5 \cdot 10^6$ oder ohne OT-II T-Zellen transferiert und somit das T- zu B-Zell-Verhältnis variiert.

Unabhängig von der Anzahl der kotransferierten transgenen T-Zellen expandierten die transgenen B-Zellen beim Kotransfer von transgenen T-Zellen wesentlich schneller (Maximum an Tag 5 statt an Tag 7 bis 10) und stärker ($\sim 2 \cdot 10^6$ versus $\sim 0,5 \cdot 10^6$ Zellen absolut), und die absolute Zellzahl nahm auch schnell nach dem Expansions-Maximum wieder ab (Abb. 9 B). Ebenso fand die Aktivierung der transgenen B-Zellen viel früher statt. Der Anteil der transgenen naiven ($\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$) B-Zellen nahm eher ab, während der Anteil der transgenen klassengewechselten ($\text{IgM}^- \text{IgD}^-$) B-Zellen früher zunahm und ein Maximum bereits an Tag 5 erreicht wurde. Dabei schien ein höherer Anteil an kotransferierten transgenen T-Zellen den Anteil der transgenen klassengewechselten B-Zellen zu vergrößern, aber am Maximum nicht höher zu sein als ohne T-Zellkotransfer (Abb. 9 C und Daten nicht gezeigt).

Um die Keimzentrums-Reaktion in der Durchflusszytometrie zu analysieren, wurden GL7 und PNA (Erdnuss Agglutinin, *peanut agglutinin*) als Marker benutzt. Der monoklonale GL7-Antikörper erkennt Neu5Ac ($\alpha 2,6$ N-Acetylneuraminsäure) auf Glycanketten. Neu5Ac wird sehr stark auf GC B-Zellen, aber auch auf Subpopulationen von aktivierten T- und B-Zellen exprimiert (Laszlo et al., 1993; Naito et al., 2007). Deshalb ist GL7 zu späten, nicht aber zu frühen Zeitpunkten ein geeigneter Marker für GC B-Zellen. Das Lektin PNA (*peanut agglutinin*) bindet Galaktosyl (β -1,3) N-Acetylgalaktosamin (Galaktosyl (β -1,3) GalNAc) und wird schon lange als Marker für GC B-Zellen verwendet (Coico et al., 1983; Muramatsu et al., 1999; Reichert et al., 1983). Die sequentielle Hoch-, Runter- und wieder Hochregulation des GL7-Epitops auf den transgenen B-Zellen verdeutlichte, dass die frühe GL7-Färbung (Tag 3 bis 5) aktivierungsbedingt stattfand und GL7 nur in Kombination mit PNA zu späten Zeitpunkten (ab Tag 7 bis 10) eindeutig GC B-Zellen in der Durchflusszytometrie definierte. Dabei konnte die GL7-Färbung an früheren Zeitpunkten als die PNA-Färbung beobachtet werden (Abb. 9 D). Wie bereits für die Expansion der transgenen B-Zellen gesehen, fand auch die aktivierungsbedingte GL7-Färbung (Tag 3 bis 5) und die Bildung von GC B-Zellen ($\text{GL7}^+ \text{PNA}^+$) (ab Tag 7) früher statt, wenn transgene T-Zellen kotransferiert wurden – und vor allem je früher, desto mehr transgene T-Zellen kotransferiert wurden und je höher das T- zu B-Zell-Verhältnis war. Ohne T-Zellkotransfer bildeten sich Keimzentren erst ab Tag 10 aus (Abb. 9 D). Am jeweiligen Maximum der Keimzentrums-Reaktion waren aber zwischen allen untersuchten Transferbedingungen keine Unterschiede in der absoluten Zellzahl der transgenen GC B-Zellen zu erkennen; allerdings wurde das Maximum beim T-Zellkotransfer aufgrund der frühen Expansion der transgenen B-Zellen bereits an Tag 3 statt an Tag 10 erreicht (Daten nicht gezeigt).

Die Kinetik für die Expansion und die Aktivierung der transgenen T-Zellen wurde durch die veränderte Zellzahl an transferierten OT-II T-Zellen nicht beeinflusst (Abb. 9 A und Daten nicht

gezeigt). Allerdings war, wie bereits in 5.2.1 beschrieben, die relative Expansion der transgenen T-Zellen höher (hier etwa doppelt so hoch), wenn weniger transgene T-Zellen transferiert wurden (Daten nicht gezeigt). Das Maximum der Expression für die Aktivierungsmarker ICOS und PD-1 war etwa an Tag 3 zu sehen. Im Gegensatz zu PD-1 und CD62L zeigte sich nur für ICOS eine leicht bessere Aktivierung (MFI für ICOS) der transgenen T-Zellen, wenn weniger transgene T-Zellen transferiert wurden und somit das T- zu B-Zell-Verhältnis erniedrigt wurde (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der extrem schnelle Verlauf der Immunreaktion (Aktivierung und Expansion der Antigen-spezifischen T- und B-Zellen) in dem bisherigen T-/B-Kooperationssystem durch den Kotransfer von transgenen T-Zellen verursacht wurde und beim alleinigen Transfer von transgenen B-Zellen nicht beobachtet wurde. Dabei spielte auch die Anzahl der transferierten transgenen T-Zellen und somit das T- zu B-Zell-Verhältnis eine wichtige Rolle.

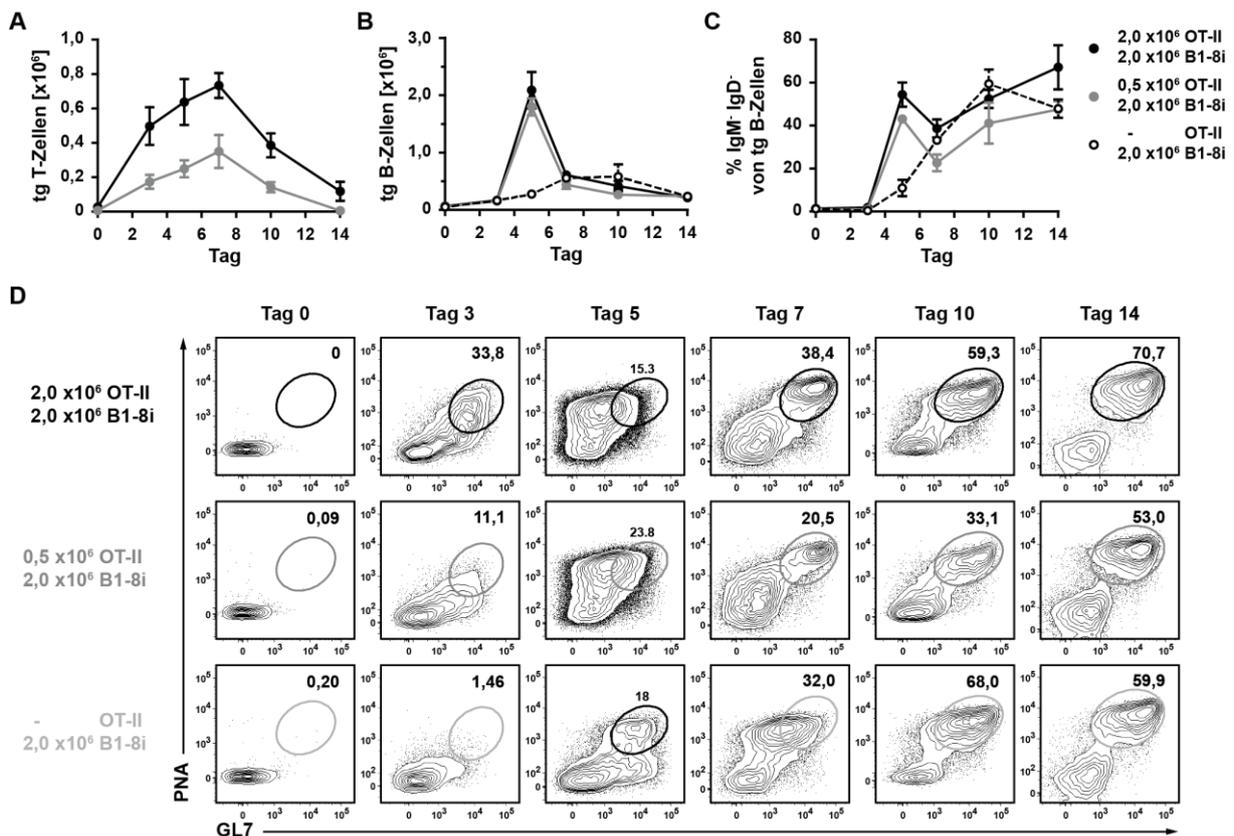


Abb. 9: Expansion und Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen bei Titration der transferierten T-Zellzahl.

$2 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen wurden mit einer variierenden Anzahl an OT-II T-Zellen ($2 \cdot 10^6$, $0,5 \cdot 10^6$ oder keine) in WT Rezipienten transferiert (T- zu B-Zell-Verhältnis: 1:1, 1:4 oder 0:1). Die Immunisierung erfolgte einen Tag später mit NP-OVA/Alum plus *B. pert.* s.c. und die durchflusszytometrische Analyse der ingLN an Tag 0, 3, 5, 7, 10 und 14. A) und B) Absolute Zellzahl der transgenen T-Zellen (lebend/B220⁺/CD4⁺/Thy-1.1⁺) bzw. B-Zellen (lebend/B Lin⁻/B220⁺/CD45.2⁺/CD45.1⁺). C) Anteil der klassengewechselten (IgM⁺ IgD⁺) Zellen von den transgenen B-Zellen. A) bis C) Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM von $n=3$ Tieren je Gruppe. D) GC B-Zellen als Anteil von den transgenen B-Zellen. Das GL7⁺ PNA⁺-Gate wurde auf die endogenen GC B-Zellen ausgerichtet und verdeutlicht die Regulation des GL7- bzw. PNA-Epitops während der Immunreaktion. Repräsentative FACS-Plots sind dargestellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Ergebnisse aus 5.2.1 wurden in weiteren Experimenten im T-/B-Kooperationssystem nur wenige OT-II T-Zellen mit den B1-8i B-Zellen kotransferiert und die Gesamtzahl der transferierten Zellen im Vergleich zum bisherigen System deutlich erniedrigt. Die Zahl der transferierten Zellen wurde auf $0,25 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und $1 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen und das T- zu B-Zell-Verhältnis somit auf 1:4 festgesetzt, um eine langsamere und somit physiologischere Kinetik in der Aktivierung und Expansion der transferierten Antigen-spezifischen T- und B-Zellen zu erzielen.

5.2.3 Expansions- und Aktivierungskinetik im optimierten adoptiven T-/B-Kooperationssystem

Wie vorangehend in 5.1.2 beschrieben, war bereits zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass eine fehlende ICOS-Kostimulation in dem adoptiven T-/B-Kooperationssystem u.a. zu einer reduzierten Expansion der Antigen-spezifischen transgenen T- und B-Zellen führte (Burmeister, 2009; Dahler, 2009). Das T-/B-Kooperationssystem mit den veränderten optimierten Zellzahlen (Transfer von $0,25 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und $1 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen) wurde auf diese Parameter hin überprüft und eine Kinetik für die Expansion und Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen sowie für die Bildung von Keimzentren unter den neuen Bedingungen mit der WT und ICOS KO Gruppe durchgeführt (Beschreibung der Gruppen siehe 5.1.1 und Abb. 7). Dabei wurden exemplarisch nur folgende Aktivierungsmarker in der Durchflusszytometrie analysiert: ICOS, PD-1 und CD62L für die transgenen T-Zellen sowie IgM, IgD, GL7 und PNA für die transgenen B-Zellen.

Wie erwartet expandierten die transgenen T- und B-Zellen in der ICOS KO Gruppe weniger stark als in der WT Gruppe, wobei der Effekt für die B-Zellen – wie bereits bekannt – drastischer war. Das Maximum der Expansion war unter den neuen Bedingungen etwa an Tag 6 zu beobachten, und somit später als unter den bisherigen Bedingungen (Maximum an Tag 4) (Abb. 10 A & B und Dahler, 2009). Die hohe Streuung in der Darstellung der absoluten Zellzahl in diesem Experiment resultiert aus der geringen Anzahl an Tieren pro Gruppe ($n = 4$), der Verwendung von nur einem drainierenden Lymphknoten für die durchflusszytometrische Analyse sowie der Präparation des Lymphknotens an sich, die allgemein mit einem unkalkulierbaren Zellverlust aufgrund des kleinen Organs verbunden ist. Für alle untersuchten Aktivierungsmarker zeigte sich die zuvor bekannte reduzierte Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen bzw. die verminderte Ausbildung von GC B-Zellen sowie klassengewechselten B-Zellen in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation. Das Maximum der ICOS- und PD-1-Expression sowie der höchste Anteil an CD62L^{low} Zellen war für die transgenen T-Zellen etwa an Tag 2 zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Der größte Anteil an transgenen klassengewechselten (IgM⁺ IgD⁺) B-Zellen zeigte sich zwischen Tag 6 und 8 (Daten nicht gezeigt). Ausgebildete transgene GC B-Zellen konnten anhand der GL7- und PNA-Färbung in der Durchflusszytometrie erst ab Tag 8 bis 10 detektiert werden und waren im Gegensatz zu den alten Transferbedingungen an Tag 14 noch vorhanden (Abb. 10 C und Daten nicht gezeigt). Die an Tag 4

sichtbaren $GL7^+ PNA^+$ Zellen sind keine GC B-Zellen, sondern nur vorübergehend aktivierungsbedingt $GL7^+$ (vergleiche Abb. 9 D und 5.2.2).

Anhand der durchflusszytometrischen Daten konnte hier gezeigt werden, dass das T-/B-Kooperationssystem mit $0,25 \cdot 10^6$ transferierten OT-II T-Zellen und $1 \cdot 10^6$ transferierten B1-8i B-Zellen zu einer langsameren Aktivierung und Expansion der transgenen T- und B-Zellen sowie einer späteren Ausbildung von Keimzentren führte als im bisherigen System und daher einen physiologischeren Verlauf der Immunantwort widerspiegelte.

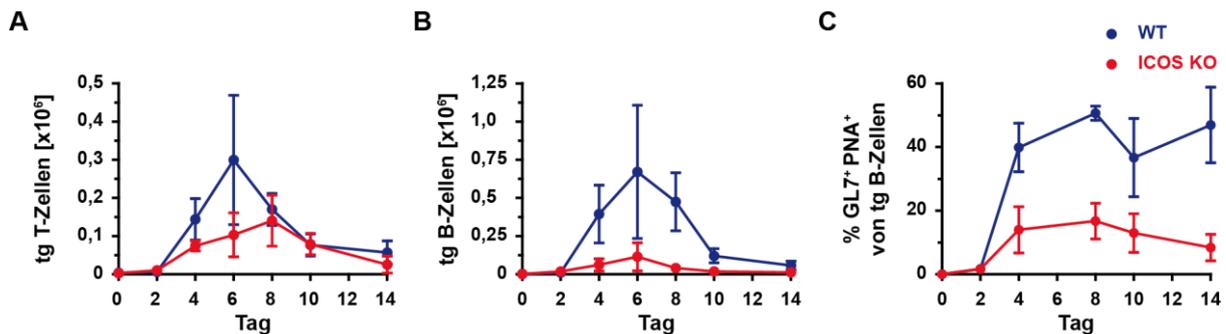


Abb. 10: Expansion der transgenen T- und B-Zellen und Bildung von transgenen GC B-Zellen.

Adoptiver Transfer von $0,25 \cdot 10^6$ OT-II.WT (WT Gruppe) oder OT-II.ICOS KO (ICOS KO Gruppe) T-Zellen jeweils zusammen mit $1 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen ($CD43^+$ Zellen depletiert) in WT (WT Gruppe) bzw. ICOS KO (ICOS KO Gruppe) Rezipienten. Immunisierung mit NP-OVA/Alum plus *B. pert.* s.c. und durchflusszytometrische Analyse von einem ingLN pro Tier. A) und B) Absolute Zellzahl der transgenen T-Zellen (lebend/B220 $\bar{}$ /CD4 $^+$ /Thy-1.1 $^+$) bzw. transgenen B-Zellen (lebend/B Lin $\bar{}$ /B220 $^+$ /CD45.2 $\bar{}$ /CD45.1 $^+$) bezogen auf beide ingLN. C) Anteil der GC B-Zellen an den transgenen B-Zellen. Das $GL7^+ PNA^+$ -Gate wurde anhand der endogenen GC B-Zellen gesetzt. A) bis C) Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM für $n = 4$ Tiere.

5.2.4 Erhöhter Anteil an T_{FH} -Zellen bei Transfer einer geringeren Anzahl an transgenen T-Zellen und bei Kotransfer von transgenen B-Zellen

Da in der vorliegenden Arbeit T_{FH} -Zellen näher untersucht werden sollten, war ein adoptives Transfersystem von Vorteil, in dem möglichst viele transgene T_{FH} -Zellen gebildet wurden. Deshalb wurden hier das optimierte T-/B-Kooperationssystem und das T-Zelltransfersystem (Transfer von $0,25 \cdot 10^6$ oder $2 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen) hinsichtlich der Generierung von T_{FH} -Zellen miteinander verglichen.

Die absolute Zellzahl sowie die Frequenz der transgenen T-Zellen waren an Tag 7 bei $0,25 \cdot 10^6$ transferierten OT-II T-Zellen unabhängig vom Kotransfer der B1-8i B-Zellen. Eine signifikante Erhöhung zeigte sich, wenn insgesamt eine höhere Anzahl an transgenen T-Zellen transferiert wurde ($2 \cdot 10^6$ versus $0,25 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen \pm B1-8i B-Zellen) (Abb. 11 A & C). Die Frequenz der T_{FH} -Zellen innerhalb der transgenen T-Zellen wurde deutlich vergrößert, wenn weniger transgene T-Zellen transferiert wurden ($2 \cdot 10^6$ versus $0,25 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen). Der Kotransfer von B1-8i B-Zellen hatte einen zusätzlichen kleinen positiven – wenn auch statistisch nicht signifikanten – Effekt auf die Generierung der T_{FH} -Zellen (Abb. 11 B & C). Die absolute Zellzahl der transgenen T_{FH} -Zellen

hingegen war unabhängig von der Anzahl der transferierten OT-II T-Zellen und dem B1-8i-B-Zellkotransfer, da mehr transgene T-Zellen in absoluten Zellzahlen vorlagen, wenn mehr OT-II T-Zellen transferiert wurden (Abb. 11 A, B & C).

Somit ergab sich eine verstärkte Bildung von T_{FH} -Zellen innerhalb der transgenen T-Zellen, wenn das optimierte T/B-Kooperationssystem anstelle des T-Zelltransfersystems mit $2 \cdot 10^6$ transferierten OT-II T-Zellen verwendet wurde. Für Experimente zur Analyse von T_{FH} -Zellen wurde deshalb das T/B-Kooperationssystem benutzt. Desweiteren bot dieses im Gegensatz zum T-Zelltransfersystem den Vorteil, gleichzeitig die Antigen-spezifischen B-Zellen analysieren zu können.

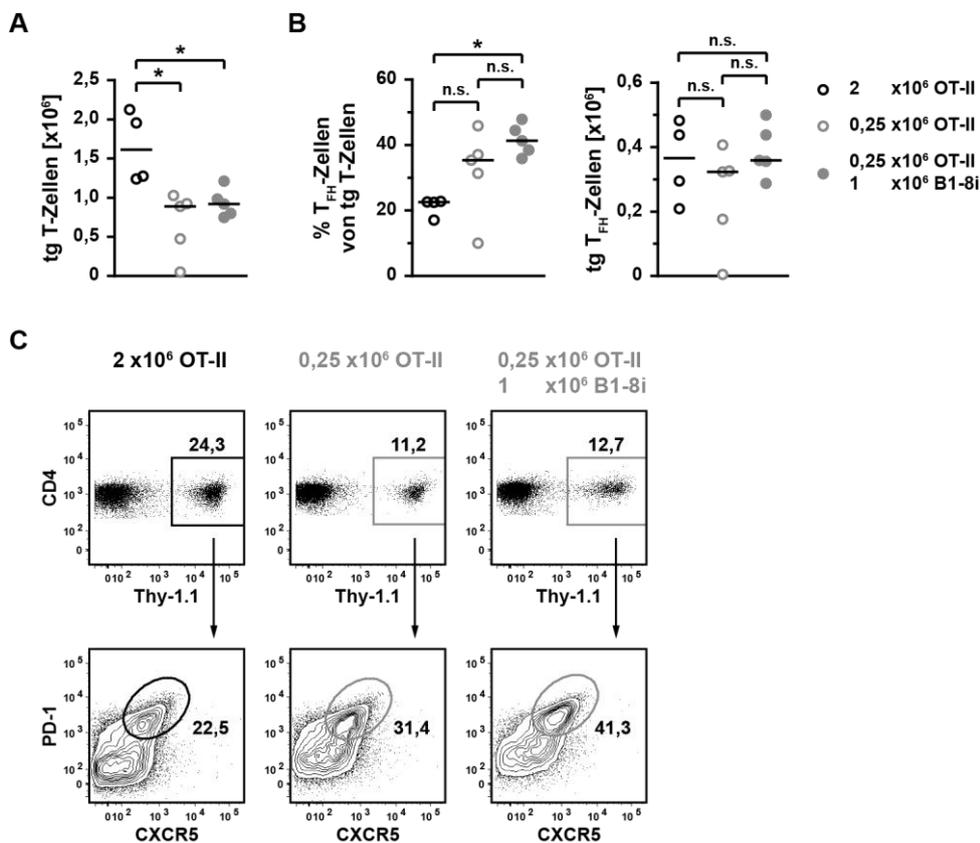


Abb. 11: Generierung von T_{FH} -Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten OT-II T-Zellen und vom B1-8i B-Zellkotransfer.

Adoptiver Transfer von $2 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen, $0,25 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen oder $0,25 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen plus $1 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen in WT Rezipienten und Immunisierung am folgenden Tag mit NP-OVA plus CFA s.c. Die ingLN wurden an Tag 7 analysiert. A) Absolute Zellzahl der transgenen T-Zellen (lebend/CD19⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺). B) Anteil der T_{FH} -Zellen (CXCR5⁺PD-1⁺) an den transgenen T-Zellen und absolute T_{FH} -Zellzahl. C) Repräsentative FACS-Plots, die den Anteil der transgenen T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen (lebend/CD19⁻/CD4⁺) bzw. den Anteil der T_{FH} -Zellen an den transgenen T-Zellen darstellen. Dieses Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit jeweils n = 4 bis 5 Tieren pro Gruppe.

5.3 Fehlende ICOS-Kostimulation: Effekte auf Antigen-spezifische T-Zellen zu frühen Zeitpunkten

Wie sich eine fehlende ICOS-Kostimulation auf Antigen-spezifische T-Zellen auswirkte, wurde teilweise von Yvonne Burmeister in ihrer Dissertation untersucht. Dabei wurde unter anderem festgestellt, dass eine Reihe von Aktivierungsmarkern (z.B. CD69, 4-1BB, CD28, GITR, OX40) auf Proteinebene zu frühen Zeitpunkten nicht differentiell reguliert wurde. Eine Ausnahme stellten CD62L und der Koinhibitor PD-1 dar, die nach Immunisierung weniger stark runter- bzw. hochreguliert wurden wie in Anwesenheit von ICOS-Kostimulation. Auch die Analyse von ~800 immunologisch relevanten Genen auf mRNA-Ebene mithilfe von TaqMan[®]-Arrays (24, 48 und 72 h nach Immunisierung) brachte keinen Aufschluss darüber, welcher molekulare Mechanismus für die geringere Expansion, erhöhte Apoptoserate und die beeinträchtigte T_{FH}-Zelldifferenzierung bei fehlender ICOS-ICOS-L-Interaktion verantwortlich war.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb weitergehende Analysen durchgeführt, um den Einfluss von ICOS auf die Expression anderer Gene und insbesondere auf die T_{FH}-Zelldifferenzierung zu frühen Zeitpunkten aufzuklären.

5.3.1 Transkriptom-Analyse von transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation

Eine umfassende Transkriptom-Analyse der transgenen T-Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Immunisierung sollte Gene identifizieren, deren Expression durch fehlende ICOS-Kostimulation beeinflusst wird. Dazu wurde ein adoptiver T-Zelltransfer in WT oder ICOS-L KO Rezipienten (WT bzw. ICOS-L KO Gruppe) durchgeführt, die transgenen T-Zellen jeweils 40 h nach Immunisierung über MACS und FACS zu hoher Reinheit sortiert und deren Gesamt-RNA isoliert (Abb. 12 A). Die isolierte RNA der transgenen T-Zellen aus den zwei verschiedenen experimentellen Bedingungen aus je zwei unabhängigen Experimenten wurde unter Verwendung des *GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array* (Affymetrix) analysiert. Somit konnte die Genexpression von 39.000 unterschiedlichen mRNA-Transkripten gleichzeitig untersucht werden.

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse sind in einem *Scatter-Plot* in Abb. 12 B dargestellt. Überraschenderweise konnten nur sehr wenige Gene (~470) identifiziert werden, die signifikant reguliert wurden; davon wurden bei fehlender ICOS-Kostimulation in den transgenen T-Zellen ~350 Gene hoch- und ~120 Gene runterreguliert. Auffällig waren zudem die nur relativ geringen Unterschiede in der Genexpression zwischen der WT und ICOS-L KO Gruppe, welche zwischen +3,0- und -4,4-fach betragen. Als am stärksten signifikant hochregulierte Gene wurden *Frat2* (+3,03), *Igf1r* (+2,67), *Sell* (+2,51), *Sema4f* (+1,77), *Pik3ip1* (+1,60) und *Bach2* (+1,54) identifiziert. Am stärksten signifikant runterreguliert waren die Gene *Il21* (-4,36), *Ifng* (-3,93), *Gzmb* (-2,69), *Sema7a*

(-2,51), *Cxcl10* (-2,51), *Il10* (-2,46) und *Blr1* (CXCR5) (-2,30) (siehe Tab. 6 bis Tab. 9). Einige der signifikant regulierten Gene sind in den Tab. 6 bis Tab. 9 nach funktionellen Gruppen zusammengefasst aufgeführt, wobei ein Gen auch mehreren funktionellen Gruppen zugeordnet sein kann.

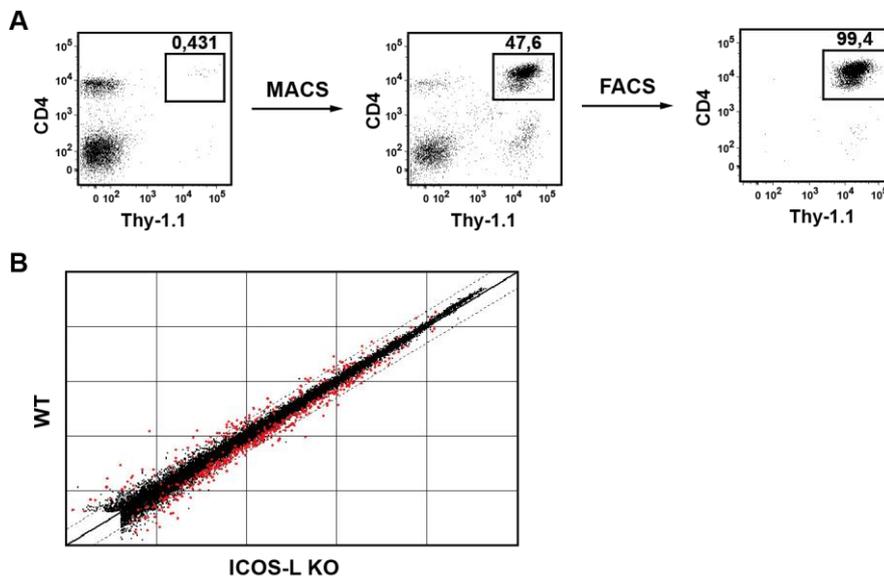


Abb. 12: Transkriptom-Analyse von transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung.

Adoptiver Transfer von $2,5 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen in WT oder ICOS-L KO Rezipienten und Immunisierung mit NP-OVA/Alum plus *B. pert. s.c.* A) MACS-Voranreicherung der transgenen (Thy-1.1⁺) T-Zellen über Thy-1.1 und FACS-Reinheitsortierung auf lebend/B220⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺ Zellen aus ingLN 40 h nach Immunisierung. Die Reinheit der sortierten Zellen betrug mindestens 99,3 % aller lebenden Zellen. Die prozentualen Anteile in den repräsentativen Plots geben die Frequenz der transgenen T-Zellen von allen lebenden Zellen an. B) Microarray-Analyse (*GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array*, Affymetrix) des Transkriptoms der transgenen T-Zellen (WT und ICOS-L KO Gruppe) aus zwei unabhängigen Experimenten. Im Diagramm ist für jedes Gen der \log_2 des Signals auf dem Chip (Mittelwert aus beiden Experimenten) der ICOS-L KO gegen die WT Gruppe aufgetragen. Signifikant regulierte Gene sind in rot dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt eine Expressionsveränderung von 1, die gestrichelten Linien eine 1,5-fache Expressionsveränderung zwischen den Gruppen dar.

Von den Genen mit einer bekannten Funktion für T_{FH}-Zellen oder für die T_{FH}-Zelldifferenzierung wurden einige signifikant reguliert (Tab. 6), meist aber nur mit einer sehr geringen Expressionsveränderung von weniger als 1,5-fach. Unter diesen Genen war *Il21* das einzige stark regulierte Gen (-4,36) und wies von allen signifikant regulierten Genen die insgesamt zweitstärkste Regulation auf. Für die Differenzierung zu T_{FH}-Zellen ist die Expression von *Sh2d1a* (SAP) (-1,19) (Yusuf et al., 2010), *Bcl6* (-1,52) (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009), *Irf4* (+1,21) (Bollig et al., 2012; Kwon et al., 2009) und *Batf* (nicht signifikant) (Betz et al., 2010; Ise et al., 2011) bei gleichzeitiger Runterregulation von *Prdm1* (BLIMP-1) (-1,8) (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009), *Stat5a* (nicht signifikant) und *Stat5b* (nicht signifikant) (Johnston et al., 2012; Nurieva et al., 2012) essentiell. Allerdings konnte hier keine selektive Runter- bzw. Hochregulation dieser Gene nachgewiesen werden, die eine beeinträchtigte T_{FH}-Zellgenerierung in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation erklärt.

Die Runterregulation von CCR7 und eine gleichzeitige Hochregulation von CXCR5 ermöglicht aktivierten T-Zellen die Wanderung von der T-Zellzone zu der B-Zellzone (Ansel et al., 1999; Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007). Ohne ICOS-Kostimulation waren diese Gene auf mRNA-Ebene allerdings stärker (*Ccr7*, +1,25) bzw. schwächer (*Blr1*, -2,30) exprimiert als in transgenen T-Zellen, die Signale über ICOS erhielten. Dies könnte auf eine schlechtere Relokalisation der transgenen T-Zellen zu der T-/B-Zellgrenze hinweisen.

Ohne ICOS-ICOS-L-Interaktion wurde die Expression bekannter kostimulatorischer Moleküle auf den transgenen T-Zellen nach Immunisierung kaum beeinflusst. Lediglich *Btla*, *Cd28* und *Icos*, die eine bekannte Funktion für T_{FH}-Zellen besitzen, wurden schwach hochreguliert (maximal +1,3-fach) (Tab. 6 und Tab. 7). Die meisten signifikant regulierten Transkriptionsfaktoren wiesen eine leicht höhere Expression in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation auf (maximal +1,5-fach) (Tab. 8). Neben *Il21* wurden auch *Ifng* (-3,9) und *Il10* (-2,5) relativ stark runterreguliert, während die Zytokine *Il2* (+1,34) und *Il16* (+1,37) schwach hochreguliert wurden (Tab. 9).

Als bekanntes Ziel der ICOS-Signaltransduktion wurde *Maf* ohne ICOS-Kostimulation wie erwartet schwächer exprimiert (-1,8) (Nurieva et al., 2003a). SLAMF6 ist für eine stabile T-/B-Zellinteraktion notwendig (Cannons et al., 2010), wurde bei fehlenden ICOS-Signalen aber schwach hochreguliert (+1,4). *Cd62l* wurde stark erhöht in transgenen T-Zellen exprimiert (+2,51), die keine ICOS-Signale erhielten; dies stimmt mit den Daten auf Proteinebene überein, die eine schwächere Runterregulation nach Aktivierung zeigten (Burmeister, 2009).

Obwohl eine fehlende ICOS-Kostimulation sehr drastische Effekte auf die Expansion und das Überleben von Antigen-spezifischen T-Zellen sowie für die Generierung von T_{FH}-Zellen hat (Burmeister, 2009), konnten 40 h nach Immunisierung nur sehr wenige Gene anhand der Microarray-Analyse nachgewiesen werden, die differentiell reguliert wurden. Zudem wiesen diese nur eine geringe Expressionsveränderung auf. Weiterhin konnte keine selektive Regulation von für die T_{FH}-Zelldifferenzierung wichtigen Genen beobachtet werden.

Tab. 6: Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: Gene mit bekannter Funktion für T_{FH}-Zellen.

Gensymbol	Genname	FC
<i>Gata3</i>	GATA binding protein 3	+1,34
<i>Btla</i>	B and T lymphocyte associated	+1,32
<i>Cd28</i>	CD28 antigen	+1,25
<i>Ccr7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7	+1,25
<i>Icos</i>	inducible T-cell co-stimulator	+1,23
<i>Irf4</i>	interferon regulatory factor 4	+1,21
<i>Sh2d1a</i>	SH2 domain protein 1A, SAP	-1,19
<i>Bcl6</i>	B cell leukemia/lymphoma 6	-1,52
<i>Tbx21</i>	T-box 21, T-bet	-1,74

Gensymbol	Genname	FC
<i>Maf</i>	avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog, c-Maf	-1,54 / -1,54 / -1,57 / -1,83
<i>Prdm1</i>	Blimp-1, PR domain containing 1, with ZNF domain	-1,8
<i>Blr1</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 5, CXCR5	-2,30
<i>Il21</i>	interleukin-21	-4,36
<i>Selplg</i>	P-selectin glycoprotein ligand 1, CD162, PSGL	n.s.
<i>Cd84</i>	CD84 antigen, SLAMF5	n.s.
<i>Il27ra</i>	interleukin-27 receptor, alpha	n.s.
<i>Cxcr4</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	n.s.
<i>Stat5a</i>	signal transducer and activator of transcription 5A	n.s.
<i>Stat3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	n.s.
<i>Batf</i>	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	n.s.
<i>Il21r</i>	interleukin-21 receptor	n.s.
<i>Stat5b</i>	signal transducer and activator of transcription 5B	n.s.
<i>Pcd1</i>	programmed cell death 1, PD-1	n.s.

Daten der Microarray-Analyse (siehe Abb. 12): Für einige ausgewählte Gene ist die n-fache Regulation (FC, *fold change*) der Genexpression in transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung in ICOS-L KO versus WT dargestellt. Eine positive Regulation definiert eine höhere Genexpression in den transgenen T-Zellen der ICOS-L KO Gruppe im Vergleich zur WT Gruppe und vice versa. War ein Gen mehrfach auf dem Genchip vorhanden, so ist die jeweilige Regulation angegeben. Ein Gen kann mehreren funktionellen Gruppen zugeordnet sein. n.s.: nicht signifikante Regulation.

Tab. 7: Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: Kostimulatoren.

Gensymbol	Genname	FC
<i>Btla</i>	B and T lymphocyte associated	+1,32
<i>Cd28</i>	CD28 antigen	+1,25
<i>Icos</i>	inducible T-cell co-stimulator	+1,23
<i>Ctla4</i>	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	n.s.
<i>Cd274</i>	programmed cell death ligand 1, Pcd11g1, PD-L1	n.s.
<i>Pcd11g2</i>	programmed cell death ligand 2, PD-L2	n.s.
<i>Tnfrsf14</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14, HVEM, LIGHT, Ly113	n.s.
<i>Tnfrsf9</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, CD137, 4-1BB, Ly63	n.s.
<i>Tnfrsf11</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11, Trance, RANKL	n.s.
<i>Tnfrsf4</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, CD134, OX40, Ly-70	n.s.
<i>CD160</i>	CD160 antigen	n.s.

Tab. 8: Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	Genname	FC
<i>Bach2</i>	BTB and CNC homology 2	+1,54 / +1,54
<i>Rere</i>	arginine glutamic acid dipeptide (RE) repeats	+1,44
<i>Klf2</i>	Kruppel-like factor 2 (lung)	+1,44

Gensymbol	Genname	FC
<i>Smad7</i>	SMAD family member 7	+1,32
<i>Irf2</i>	interferon regulatory factor 2	+1,32
<i>Klf13</i>	Kruppel-like factor 13	+1,21
<i>Smad2</i>	SMAD family member 2	+1,21
<i>Irf4</i>	interferon regulatory factor 4	+1,21
<i>Stat1</i>	signal transducer and activator of transcription 1	-1,25 / -1,25
<i>Irf8</i>	interferon regulatory factor 8	-1,71 / -1,80
<i>Foxp1</i>	forkhead box 1	n.s.
<i>Nfatc1</i>	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	n.s.

Tab. 9: Regulation der Genexpression in transgenen T-Zellen in ICOS-L KO versus WT: sonstige Gene.

Gensymbol	Genname	FC
<i>Frat2</i>	frequently rearranged in advanced T cell lymphomas 2, GSK-3 binding protein FRAT2	+3,03
<i>Igf1r</i>	insulin-like growth factor I receptor	+2,67 / +2,07
<i>Sell</i>	L-selectin, CD72L	+2,51 / +2,30
<i>Sema4f</i>	semaphorin-4F	+1,77
<i>Pik3ip1</i>	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	+1,60
<i>Bcl2</i>	B cell leukemia/lymphoma 2	+1,46
<i>Slamf6</i>	SLAM family member 6, Ly108	+1,44 / +1,19
<i>Pik3cd</i>	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide, p110 delta	+1,41 / +1,34
<i>Il16</i>	interleukin-16	+1,37 / +1,30
<i>Il6st</i>	interleukin-6 signal transducer, IL-6R-beta, IL-6RB	+1,37
<i>Pdcd4</i>	programmed cell death 4	+1,37
<i>Il2</i>	interleukin-2	+1,34
<i>Ly6a</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus A, Sca-1	-1,49
<i>Cxcr3</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	-1,63
<i>Il10</i>	interleukin-10	-2,46
<i>Cxcl10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2,51
<i>Sema7a</i>	semaphorin-7A	-2,51
<i>Gzmb</i>	granzyme B, Ctla1	-2,69
<i>Ifng</i>	interferon- γ	-3,93
<i>Peli1</i>	pellino-1	n.s.
<i>Ipmk</i>	inositol polyphosphate multikinase	n.s.

5.3.2 Validierung der Genexpression von einigen ausgewählten Genen über *realtime*-RT-PCR

Die in der Transkriptom-Analyse (5.3.1) nachgewiesenen Genexpressionsunterschiede in den transgenen T-Zellen der ICOS-L KO versus WT Gruppe 40 h nach Immunisierung wurde für einige ausgewählte Gene über eine zweite Methode validiert. Dazu wurde eine quantitative *realtime*-RT-PCR mit derselben RNA wie in der Microarray-Analyse (siehe 5.3.1) durchgeführt. Es wurden Gene

getestet, deren Expression in differenzierten T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten (Tag 6) entscheidend von ICOS abhängig schien (siehe 5.5.12).

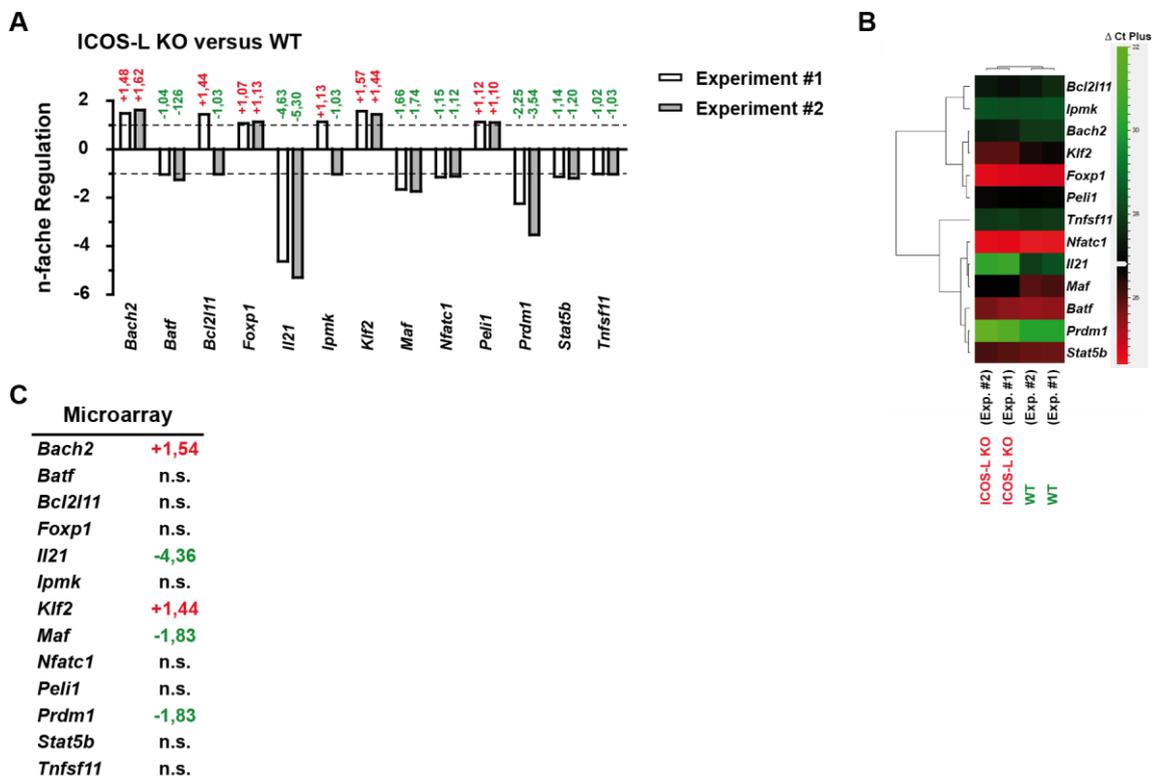


Abb. 13: Validierung der Genexpression in transgenen T-Zellen mittels *realtime*-RT-PCR.

Die Genexpression in transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung in ICOS-L KO versus WT Rezipienten wurde über *realtime*-RT-PCR quantifiziert. Für die Normalisierung wurden die Haushalt-Gene *Hprt1* und $\beta 2m$ verwendet. Es wurde dieselbe RNA aus zwei unabhängigen Experimenten wie für die Microarray-Analyse (Abb. 12) eingesetzt. A) Für jedes Gen ist die n-fache Regulation in den transgenen T-Zellen der ICOS-L KO Gruppe im Vergleich zur WT Gruppe für das jeweilige Experiment dargestellt. Die Zahl über den Balken gibt den genauen Wert der Regulation an. Die gestrichelte Linie zeigt eine Regulation von 1 an. B) Heatmap und Cluster-Analyse der untersuchten Gene. In rot sind Gene mit einem hohen, in schwarz Gene mit einem mittleren und in grün Gene mit einem niedrigen Expressionsniveau dargestellt, das sich anhand der Ct-Werte der *realtime*-RT-PCR ergibt. Die Ct-Werte sind mit den Haushalt-Genen normalisiert. C) N-fache Regulation der Genexpression in der Microarray-Analyse aus beiden unabhängigen Experimenten, n.s.: nicht signifikante Regulation.

Die Daten der *realtime*-RT-PCR (Abb. 13 A) bestätigten die Ergebnisse der Microarray-Analyse (Abb. 13 C). Für Gene, die im Microarray als signifikant reguliert identifiziert wurden (*Bach2*, *Il21*, *Klf2*, *Maf* und *Prdm1*), konnte für beide unabhängige Experimente auch in der *realtime*-RT-PCR eine Regulation von etwa der gleichen Stärke nachgewiesen werden. Für *Prdm1* ergab sich sogar eine stärkere Regulation als im Microarray (Abb. 13 A). Dabei wurden *Bach2* und *Klf2* bei fehlender ICOS-Kostimulation stärker und *Il21*, *Maf* und der Transkriptionsfaktor *Prdm1* schwächer exprimiert. Für die in der Microarray-Analyse als nicht signifikant reguliert identifizierten Gene *Batf*, *Foxp1*, *Nfatc1*, *Peli1*, *Stat5b* und *Tnfsf11* konnte nur eine sehr schwache bis keine Regulation (maximal 1,26-fach) beobachtet werden, während für *Bcl2l11* und *Ipmk* in den beiden unabhängigen Experimenten sogar eine entgegengesetzte sehr schwache Regulation beobachtet wurde (Abb. 13 A).

Die Expression dieser beiden Gene schien somit durch die fehlende ICOS-Kostimulation in den transgenen T-Zellen nicht beeinflusst zu werden.

Die Heatmap und Cluster-Analyse in Abb. 13 B verdeutlicht die Expressionsstärke der untersuchten Gene in der ICOS-L KO und WT Gruppe der beiden unabhängigen Experimente.

5.3.3 Die initiale T_{FH}-Zelldifferenzierung scheint unabhängig von ICOS zu sein

Durch frühere Studien zeichnete sich eine wichtige Rolle von ICOS für T_{FH}-Zellen ab: sowohl ICOS KO als auch ICOS-L KO Mäuse weisen eine drastisch verringerte Anzahl an T_{FH}-Zellen nach Immunisierung auf (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006; Nurieva et al., 2008), aber auch transgene T-Zellen, die in einem adoptiven Transfersystem in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation aktiviert wurden, zeigten nur einen sehr geringen Anteil an T_{FH}-Zellen (Burmeister, 2009). Der genaue Mechanismus, der die Differenzierung von T_{FH}-Zellen induziert, ist bislang nicht bekannt. Vor allem ist unklar, ob ICOS für die initiale Differenzierung zu T_{FH}-Zellen oder für das Überleben der differenzierten T_{FH}-Zellen wichtig ist. Beide Mechanismen würden zu einer reduzierten Anzahl an T_{FH}-Zellen zu späteren Zeitpunkten der Immunreaktion führen.

Die Expression des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 ist für die Differenzierung von T_{FH}-Zellen essentiell (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). Eine posttranskriptionale sowie posttranslationale Regulation der *Bcl6*-Expression kann zu einem erheblichen Unterschied in der gemessenen Expression auf mRNA- und Protein-Ebene führen (Allman et al., 1996; Crotty et al., 2010; Saito et al., 2006). Obwohl *Bcl6* auf mRNA-Ebene eine -1,5-fache Regulation bei fehlender ICOS-Kostimulation aufwies (siehe 5.3.1), war die Analyse der BCL-6-Expression auf Proteinebene entscheidend, um die Rolle von ICOS auf die frühe T_{FH}-Zelldifferenzierung zu analysieren. Dazu wurde im adoptiven T/B-Kooperationssystem die BCL-6-Expression in transgenen T-Zellen in der WT im Vergleich zur ICOS-L KO Gruppe an Tag 3 gemessen. Desweiteren wurde die Expression von CXCR5 sowie dem Koinhibitor und T_{FH}-Zellmarker PD-1 gemessen. Der Chemokinrezeptor CXCR5 wird von T_{FH}-Zellen exprimiert und dessen Expression ist für die Lokalisation von T- und B-Zellen in den B-Zellfollikeln notwendig (Ansel et al., 1999; Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007).

Die transgenen T-Zellen regulierten BCL-6 an Tag 3 unabhängig von einer ICOS-Kostimulation hoch. Im Gegensatz zu den mRNA-Daten (siehe 5.3.1) war kein Unterschied in der Expression zwischen den beiden Gruppen zu erkennen (Abb. 14 A). CXCR5 hingegen wurde in der ICOS-L KO Gruppe in den transgenen T-Zellen weniger stark hochreguliert als in der WT Gruppe (Abb. 14 B); der Effekt war deutlich, auch wenn hier nicht signifikant, und bestätigte die mRNA-Daten (-2,3-fache Regulation, siehe 5.3.1). Für PD-1 zeigte sich eine niedrigere Expression in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation, aber dennoch eine deutliche Hochregulation im Vergleich zu den endogenen T-Zellen (Abb. 14 C). Da *Pdcd1* (PD-1) auf mRNA-Ebene keine differentielle Regulation zeigte (siehe 5.3.1), wies dies auf eine posttranskriptionale Regulation von *Pdcd1* durch ICOS hin.

Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass ICOS die Expression des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 auf Proteinebene zu frühen Zeitpunkten nicht beeinflusste und somit nicht an der initialen Induktion des T_{FH}-Zelldifferenzierungsprogrammes beteiligt war. Die Expression von CXCR5 und PD-1 hingegen wurde durch fehlende ICOS-Kostimulation zwar beeinträchtigt, die aktivierungsbedingte Hochregulation aber nicht komplett unterbunden.

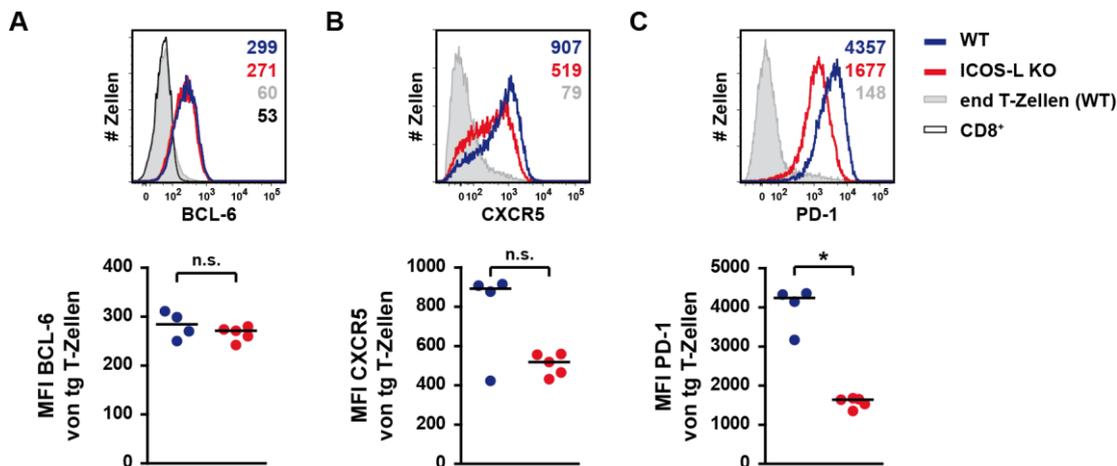


Abb. 14: Expression von BCL-6, CXCR5 und PD-1 in transgenen T-Zellen an Tag 3.

0,25·10⁶ OT-II.WT T-Zellen wurden zusammen mit 1·10⁶ CD43-depletierten B1-8i.WT oder B1-8i.ICOS-L KO B-Zellen in WT (WT Gruppe) bzw. in ICOS-L KO Rezipienten (ICOS-L KO Gruppe) transferiert. Die Immunisierung erfolgte mit NP-OVA plus CFA s.c. und die ingLN wurden an Tag 3 analysiert. Der MFI für BCL-6 (A), CXCR5 (B) und PD-1 (C) auf den transgenen T-Zellen ist dargestellt. Die Histogramme sind repräsentativ und zeigen im Vergleich die Expression auf endogenen (end), nicht aktivierten T-Zellen der WT Gruppe. Die Zahlen im Plot geben den MFI an. Die Spezifität der BCL-6 Färbung wird im Histogramm durch die zusätzliche Überlagerung mit CD8⁺ Zellen, die kein BCL-6 exprimieren, verdeutlicht.

5.3.4 Migration der transgenen T-Zellen in die B-Zellfollikel wird durch fehlende ICOS-Kostimulation nicht beeinträchtigt

In den transgenen T-Zellen wurde der Chemokinrezeptor CXCR5 auf mRNA- sowie Proteinebene bei fehlender ICOS-Kostimulation 40 h bzw. an Tag 3 nach Immunisierung nicht so stark hochreguliert wie in den transgenen T-Zellen, die Signale über ICOS erhielten (siehe 5.3.1 und 5.3.3). *Ccr7* hingegen zeigte auf mRNA-Ebene 40 h nach Immunisierung in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation eine höhere Expression und wurde demnach nach der T-Zellaktivierung nicht oder nicht so stark runterreguliert wie in Anwesenheit von ICOS-Signalen (siehe 5.3.1). Für die Migration von T-Zellen von der T-Zellzone in die B-Zellfollikel ist neben der Hochregulation von CXCR5 die gleichzeitige Runterregulation des Chemokinrezeptors CCR7 notwendig (Ansel et al., 1999; Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007). Deshalb sollte hier in der Histologie überprüft werden, ob die bei fehlender ICOS-Kostimulation veränderte CXCR5- und CCR7-Expression die Migration der transgenen T-Zellen in die B-Zellzone beeinträchtigt, wo diese für die weitere Differenzierung zu T_{FH}-Zellen wichtige Signale von Antigen-spezifischen B-Zellen erhalten (Crotty, 2011; Ma et al., 2012).

An Tag 4 nach Immunisierung konnten transgene T-Zellen sowohl in der WT als auch der ICOS KO Situation in den B-Zellfollikeln nachgewiesen werden (Abb. 15). Desweiteren konnte für einige dieser transgenen T-Zellen ein Kontakt mit transgenen Antigen-spezifischen B-Zellen beobachtet werden, der unabhängig von ICOS war. Die Migration der transgenen T-Zellen in die B-Zellfollikel war demnach bei fehlender ICOS-Kostimulation nicht eingeschränkt.

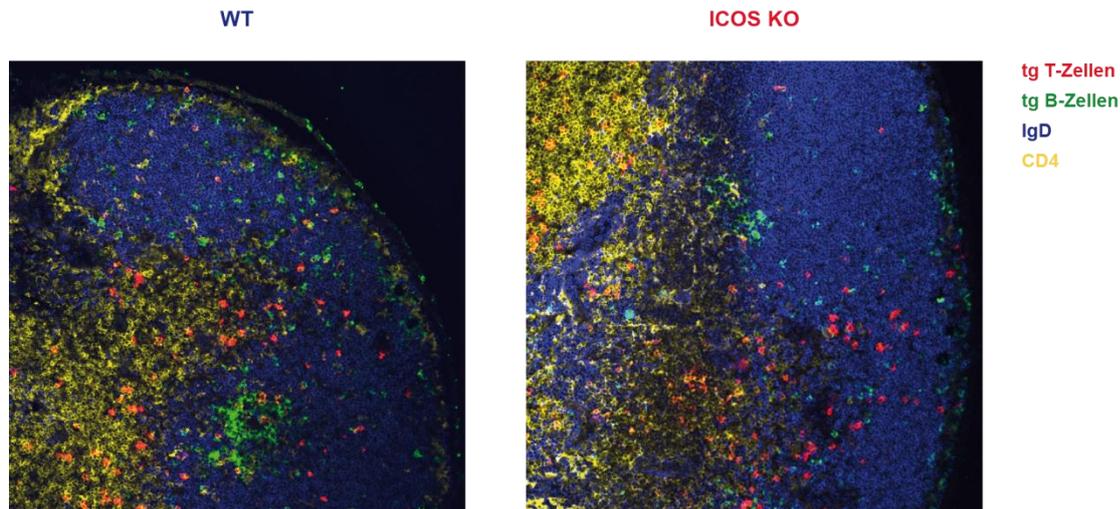


Abb. 15: Lokalisation von transgenen T- und B-Zellen in ingLN an Tag 4.

Adoptiver Transfer von $0,25 \cdot 10^6$ OT-II.WT oder OT-II.ICOS KO T-Zellen zusammen mit $1 \cdot 10^6$ B1-8i.WT B-Zellen (CD43⁺ Zellen depletiert) in WT (WT Gruppe) bzw. ICOS KO (ICOS KO Gruppe) Rezipienten. Immunisierung mit NP-OVA/Alum plus *B. pert.* s.c. und Analyse eines ingLN je Tier an Tag 4. Es ist dasselbe Experiment wie in Abb. 10 gezeigt. Kryoschnitte wurden mit Antikörpern gegen Thy-1.1 (transgene T-Zellen, rot), CD45.1 (transgene B-Zellen, grün), IgD (B-Zellzone, blau) und CD4 (T-Zellzone, gelb) gefärbt.

Zu frühen Zeitpunkten wurde bei fehlender ICOS-Kostimulation weder in transgenen T-Zellen die Expression des Mastertranskriptionsfaktors für T_{FH}-Zellen BCL-6 noch die Migration der transgenen T-Zellen in die B-Zellzone, wo diese weiter zu T_{FH}-Zellen differenzieren, beeinflusst. ICOS hat daher offensichtlich keinen Einfluss auf frühe Ereignisse, die für die Differenzierung von aktivierten T-Zellen zu T_{FH}-Zellen von entscheidender Bedeutung sind.

5.4 T-Zell-intrinsische und T-Zell-extrinsische Effekte der fehlenden ICOS-Kostimulation

In 5.3 konnte gezeigt werden, dass ICOS offenbar für die Induktion der T_{FH}-Zelldifferenzierung zu frühen Zeitpunkten keine Rolle spielt. Deshalb sollte näher untersucht werden, wie sich eine fehlende ICOS-ICOS-L-Interaktion zu späten Zeitpunkten der Immunreaktion auf T_{FH}-Zellen und die GC B-Zellen auswirkt, und ob diese Effekte T-Zell-intrinsischen oder T-Zell-extrinsischen Ursprungs sind.

5.4.1 ICOS-Expression auf Antigen-spezifischen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen

ICOS wird von vielen Arbeitsgruppen – besonders im humanen Feld – in Kombination mit CXCR5 verwendet, um T_{FH} -Zellen zu definieren. In dem hier verwendeten T-/B-Kooperationssystem erreichte die ICOS-Expression auf den Antigen-spezifischen T-Zellen etwa an Tag 2 ihr Maximum, war aber auch zu späten Zeitpunkten (Tag 6 bis 14) noch relativ hoch (Daten nicht gezeigt). Bei der genaueren Betrachtung der ICOS-Expression auf T_{FH} - versus nicht- T_{FH} -Zellen (definiert über CXCR5 und PD-1, Abb. 16 A) im drainierenden Lymphknoten an Tag 6 nach Immunisierung fällt auf, dass die transgenen Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen nur im Vergleich mit den endogenen nicht- T_{FH} -Zellen eine höhere ICOS-Expression aufwiesen. Die transgenen nicht- T_{FH} -Zellen exprimierten ICOS sogar auf einem leicht höheren Niveau als die transgenen T_{FH} -Zellen. Die höchste ICOS-Expression war auf den endogenen T_{FH} -Zellen nachzuweisen (Abb. 16 B). Die transgenen nicht- T_{FH} -Zellen waren ebenso wie die transgenen T_{FH} -Zellen aktiviert und verfügten an Tag 6 im Vergleich zu den nicht-aktivierten endogenen nicht- T_{FH} -Zellen über eine erhöhte PD-1-Expression (Abb. 16 A) und eine erniedrigte CCR7-Expression (Daten nicht gezeigt), sowie eine höhere BCL-6-Expression (Daten nicht gezeigt, siehe 5.4.2 und Abb. 17 B).

ICOS konnte demnach in dem vorliegenden T-/B-Kooperationssystem nicht als geeigneter Marker benutzt werden, um murine T_{FH} -Zellen zu definieren.

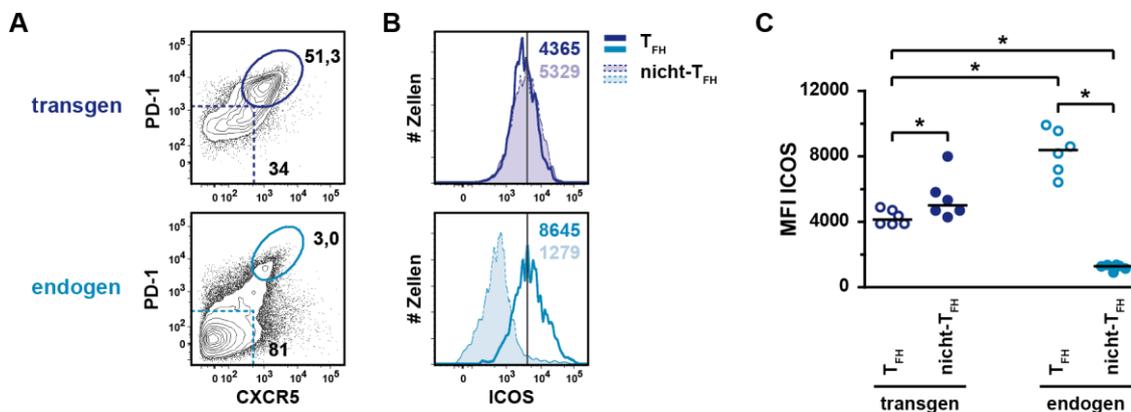


Abb. 16: ICOS-Expression auf transgenen und endogenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen.

Adoptiver Transfer von OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen (CD43⁺ Zellen depletiert) und Immunisierung mit NP-OVA plus CFA. Analyse der ingLN an Tag 6. A) *Gating* der T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen auf transgenen (lebed/CD19⁺/CD4⁺/Thy-1.1⁺) bzw. endogenen (lebed/CD19⁺/CD4⁺/Thy-1.1⁺) T-Zellen über CXCR5 und PD-1. B) Repräsentative Histogramm-Plots für die ICOS-Expression auf transgenen bzw. endogenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen. Die Zahlen im Plot geben den MFI an. ICOS wurde mit dem hochaffinen Klon MIC-2043 gefärbt. C) Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben verwendet. Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente für die Analyse an Tag 6 bis 8 (Verwendung des Klons MIC-2043 oder MIC-280).

5.4.2 In Abwesenheit von ICOS-Kostimulation werden weniger T_{FH} -Zellen, GC T_{FH} -Zellen und GC B-Zellen gebildet

Eine Untersuchung im T/B-Kooperationssystem zu späten Zeitpunkten zeigte, dass bei fehlender ICOS-Kostimulation ein stark verminderter Anteil an transgenen T_{FH} -Zellen an Tag 6 vorlag, der auch an Tag 8 und 14 nachzuweisen war (Abb. 17 A und Daten nicht gezeigt). Dabei konnten die transgenen T_{FH} -Zellen nicht nur über CXCR5 und PD-1, sondern auch über CXCR5 und ihren Mastertranskriptionsfaktor BCL-6 definiert werden (Abb. 17 A). Die als CXCR5⁺ PD-1⁺ definierten transgenen T_{FH} -Zellen besaßen einen höheren MFI für BCL-6 als die als CXCR5⁻ PD-1⁻ definierten transgenen nicht- T_{FH} -Zellen (Abb. 17 B). Die transgenen T_{FH} -Zellen konnten somit in der Durchflusszytometrie über CXCR5 und PD-1 ausreichend definiert werden. Interessanterweise exprimierten auch die transgenen nicht- T_{FH} -Zellen sowohl in der WT als auch der ICOS-L KO Gruppe in einem geringen Maße BCL-6. Zum Vergleich wurden endogene nicht- T_{FH} -Zellen sowie als Negativ-Kontrolle CD8⁺ Zellen herangezogen (Abb. 17 B und Daten nicht gezeigt). Die wenigen transgenen T_{FH} -Zellen, die sich trotz fehlender ICOS-Kostimulation ausbildeten, wiesen zu allen untersuchten Zeitpunkten (Tag 6, 8 und 14) die gleiche Expressionsstärke von BCL-6 auf wie die T_{FH} -Zellen der WT Gruppe (Abb. 17 D und Daten nicht gezeigt).

An Tag 6 und 8 gehörten ~15 %, an Tag 14 ~30 % der transgenen T_{FH} -Zellen zum Subtyp der GL7⁺ GC T_{FH} -Zellen (Yusuf et al., 2010). In Abwesenheit von ICOS-Kostimulation war dieser Subtyp innerhalb des reduzierten T_{FH} -Zellpools an allen analysierten Tagen noch einmal spezifisch verringert (Abb. 17 C und Daten nicht gezeigt).

Der bei fehlender ICOS-ICOS-L-Interaktion an Tag 6 bis 14 beobachtete verminderte Anteil an transgenen T_{FH} -Zellen und insbesondere an transgenen GC T_{FH} -Zellen, die eine erhöhte Fähigkeit zur B-Zellhilfe besitzen (Yusuf et al., 2010), korrelierte mit einem drastisch reduzierten Anteil an transgenen GC B-Zellen sowie klassengewechselten (IgM⁻ IgD⁻) B-Zellen an den späten Analysezeitpunkten Tag 8 und 14 (Abb. 17 E und Daten nicht gezeigt).

Eine fehlende ICOS-Kostimulation führt zu späten Zeitpunkten nicht nur zu einem reduzierten Anteil an transgenen T_{FH} -Zellen, sondern auch spezifisch zu einer beeinträchtigten Ausbildung von GC T_{FH} -Zellen. Die BCL-6-Expression in den transgenen T_{FH} -Zellen hingegen war durch die fehlende ICOS-ICOS-L-Interaktion nicht beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass die T_{FH} -Zellen bei fehlender ICOS-Kostimulation zumindest die Fähigkeit besitzen, eine volle T_{FH} -Zellfunktion auszubilden. Der Defekt in der Generierung von transgenen T_{FH} -Zellen in Abwesenheit von ICOS-Signalen stand in direktem Zusammenhang mit einer beeinträchtigten Ausbildung von transgenen GC B-Zellen.

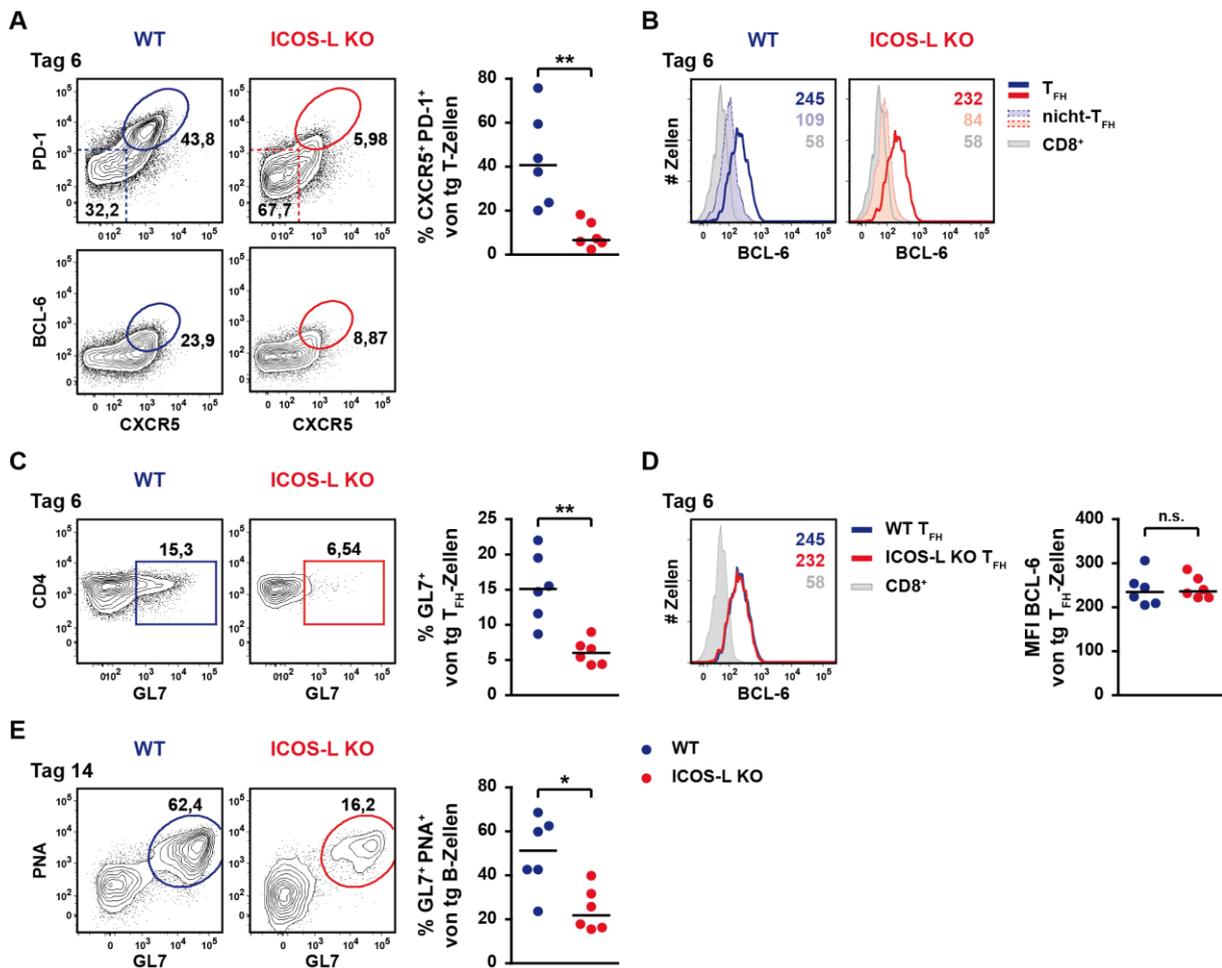


Abb. 17: Verminderte Anzahl an T_{FH}-Zellen, GC T_{FH}-Zellen und GC B-Zellen in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation.

0,25·10⁶ OT-II T-Zellen wurden mit 1·10⁶ B1-8i.WT oder B1-8i.ICOS-L KO B-Zellen in WT (WT Gruppe) bzw. ICOS-L KO (ICOS-L KO Gruppe) Rezipienten transfertiert. Immunisierung mit NP-OVA plus CFA und Analyse der ingLN an Tag 6, 8 und 14. A) Tag 6: Repräsentative FACS-Plots geben den Anteil der T_{FH}-Zellen (CXCR5⁺PD-1⁺ oder CXCR5⁺BCL-6⁺) und der nicht-T_{FH}-Zellen (CXCR5⁻PD-1⁻) an den transgenen T-Zellen (lebens/CD19⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺) an. B) Histogramm-Überlagerung der BCL-6-Expression von T_{FH}- (CXCR5⁺PD-1⁺) und nicht-T_{FH}-Zellen (CXCR5⁻PD-1⁻) mit CD8⁺ Zellen. Die Zahlen im Plot geben den MFI an. C) Tag 6: Anteil der GL7⁺ GC T_{FH}-Zellen bezogen auf transgene T_{FH}-Zellen (CXCR5⁺PD-1⁺), gezeigte FACS-Plots sind repräsentativ. D) Tag 6: BCL-6 MFI von transgenen T_{FH}-Zellen (CXCR5⁺PD-1⁺) der WT und ICOS-L KO Gruppe. Repräsentative Histogramm-Überlagerung mit CD8⁺ Zellen ist gezeigt. Die Zahlen im Plot geben den MFI an. E) Tag 14: GC B-Zellen (GL7⁺PNA⁺) als Anteil von transgenen B-Zellen (lebens/B Lin⁻/CD19⁺/CD45.2⁻/CD45.1⁺), repräsentative FACS-Plots sind dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für ein bis fünf unabhängige Experimente.

5.4.3 Die verminderte T_{FH}-Zelldifferenzierung in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation ist ein T-Zell-intrinsischer Effekt

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die in 5.4.2 beobachteten Defekte auf T-Zell-intrinsische oder T-Zell-extrinsische Effekte zurückzuführen sind. Es ist möglich, dass ein Defekt in der Ausbildung von T_{FH}-Zellen zu einer reduzierten Ausbildung von Keimzentren führt oder eine beeinträchtigte Ausbildung von Keimzentren zu einer verminderten Generierung von T_{FH}-Zellen führt.

Die zweite Hypothese unterstützen Arbeiten, die zeigen konnten, dass die Generierung und/oder Aufrechterhaltung von T_{FH} -Zellen von der Interaktion mit entsprechenden GC B-Zellen abhängig ist (Akiba et al., 2005; Haynes et al., 2007; Johnston et al., 2009) bzw. T_{FH} -Zellen für ihre optimale Differenzierung auf Signale von B-Zellen angewiesen sind (Nurieva et al., 2008). Andererseits ist bekannt, dass T_{FH} -Zellen für die Bildung von Keimzentren unentbehrlich sind (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009).

Um zwischen T-Zell-intrinsischen und -extrinsischen Effekten unterscheiden zu können, wurde in dieser Arbeit ein erweitertes T-/B-Kooperationssystem etabliert, in dem simultan Antigen-spezifische OT-II.WT und OT-II.ICOS KO T-Zellen und Antigen-spezifische B1-8i B-Zellen transferiert wurden. In diesem System konnten die transgenen WT T-Zellen über die differentielle Expression der kongenen Marker Thy-1.1 und Thy-1.2 von den nur Thy-1.1-exprimierenden ICOS KO T-Zellen unterschieden werden (Abb. 18). In diesem System können aufgrund der ermöglichten ICOS-ICOS-L-Interaktion die transgenen WT T-Zellen zu T_{FH} -Zellen und die transgenen B-Zellen zu GC B-Zellen differenzieren. Außerdem haben die transgenen WT und ICOS KO T-Zellen die gleiche Umgebung mit entwickelten Keimzentren, so dass indirekte Effekte einer fehlenden ICOS-ICOS-L-Interaktion – z.B. durch fehlende GC B-Zellen – keine Auswirkung auf die Differenzierung der transgenen ICOS KO T-Zellen zu T_{FH} -Zellen haben.

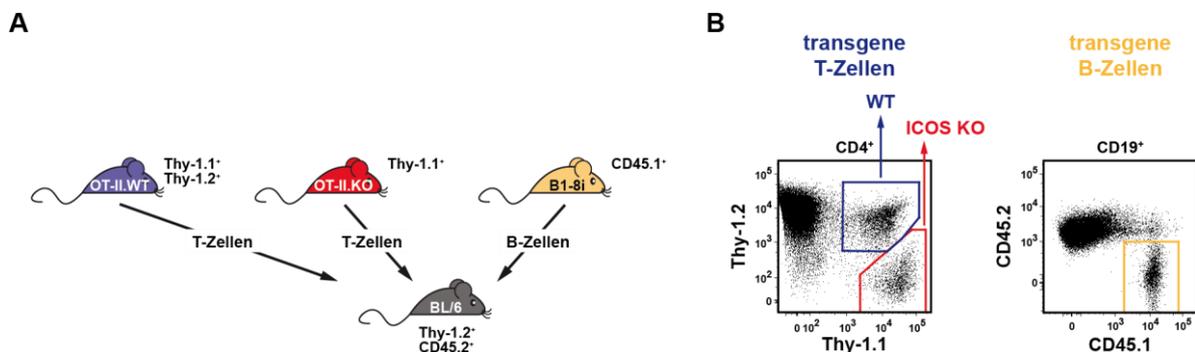


Abb. 18: Erweitertes T-/B-Kooperationssystem mit simultanem Transfer von transgenen WT und ICOS KO T-Zellen.

A) OT-II.WT ($Thy-1.1^+ Thy-1.2^+$) und OT-II.ICOS KO ($Thy-1.1^+ Thy-1.2^-$) T-Zellen werden zusammen mit B1-8i ($CD45.1^+$) B-Zellen in syngene $Thy-1.2^+ CD45.2^+$ Rezipienten transferiert. B) Transgene WT und ICOS KO T-Zellen können in der Durchflusszytometrie anhand der differentiellen Expression von Thy-1.1 und Thy-1.2 unterschieden werden. Die transgenen B-Zellen werden wie im einfachen T-/B-Kooperationssystem anhand des kongenen Markers CD45.1 identifiziert.

Um zwischen T-Zell-intrinsischen und -extrinsischen Effekten sowie Effekten durch endogene T-Zellen unterscheiden zu können, wurden unterschiedliche Gruppen verwendet, in denen entweder nur transgene WT oder ICOS KO T-Zellen oder beide gemeinsam in WT und/oder ICOS KO Rezipienten transferiert wurden. Die Ausbildung von transgenen T_{FH} -Zellen und GC B-Zellen wurde an Tag 8 nach Immunisierung untersucht.

Transgene ICOS KO T-Zellen konnten weder beim Transfer in ICOS KO noch beim Transfer in WT Rezipienten zu T_{FH}-Zellen differenzieren (Abb. 19 A), auch wenn in den WT Rezipienten der Anteil an transgenen GC B-Zellen aufgrund der wenigen endogenen Antigen-spezifischen T-Zellen leicht erhöht war (Abb. 19 C). In den ICOS KO Rezipienten waren nur sehr wenige transgene GC B-Zellen zu erkennen (Abb. 19 C). Wurden die transgenen ICOS KO T-Zellen hingegen zusammen mit den transgenen WT T-Zellen in WT Rezipienten transferiert, so konnten die transgenen B-Zellen ungehindert zu GC B-Zellen differenzieren – es gab keinen Unterschied zu der Gruppe, in der nur transgene WT T-Zellen transferiert wurden, aber eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den beiden Gruppen, in denen nur transgene ICOS KO T-Zellen transferiert wurden (Abb. 19 C). Trotz der ausgebildeten transgenen GC B-Zellen zeigten die transgenen ICOS KO T-Zellen im Vergleich zu den transgenen WT T-Zellen einen drastischen Defekt in der Differenzierung zu T_{FH}-Zellen (Abb. 19 A). Dieser Defekt war dadurch direkt auf die fehlende ICOS-Signaltransduktion in den ICOS KO T-Zellen zurückzuführen und somit T-Zell-intrinsisch. Allerdings konnte für die transgenen ICOS KO T-Zellen eine sehr kleine, aber dennoch signifikante Zunahme in dem Anteil der T_{FH}-Zellen beobachtet werden, wenn zusätzlich transgene WT T-Zellen in die WT Rezipienten transferiert wurden und eine Keimzentrums-Bildung stattfand (Abb. 19 A & C). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch indirekte T-Zell-extrinsische Effekte neben der ICOS-Kostimulation einen kleinen Einfluss auf die Generierung von T_{FH}-Zellen haben.

Mit diesem experimentellen Ansatz zur Unterscheidung von T-Zell-intrinsischen und T-Zell-extrinsischen Effekten wurde auch die T_{FH}-Zellsubpopulation der GC T_{FH}-Zellen näher untersucht, die bei fehlender ICOS-Kostimulation zusätzlich spezifisch erniedrigt war (siehe 5.4.2). Auch bei Anwesenheit von transgenen WT T_{FH}-Zellen und transgenen GC B-Zellen ist der Anteil der GC T_{FH}-Zellen innerhalb der wenigen transgenen ICOS KO T_{FH}-Zellen im Vergleich zu den transgenen WT T_{FH}-Zellen spezifisch vermindert. Dennoch ist der Anteil der transgenen ICOS KO GC T_{FH}-Zellen höher, als wenn keine transgenen WT T-Zellen kotransferiert werden und somit weniger GC B-Zellen entstehen (Abb. 19 B). Für die Generierung der GC T_{FH}-Zellen scheinen sowohl T-Zell-intrinsische als auch T-Zell-extrinsische Effekte bei fehlender ICOS-ICOS-L-Interaktion eine Rolle zu spielen.

In dem neu etablierten erweiterten T-/B-Kooperationssystem konnte hier erstmals gezeigt werden, dass bei einer fehlenden Kostimulation über ICOS der Defekt in der T_{FH}-Zelldifferenzierung T-Zell-intrinsisch war und nicht durch indirekte Effekte wie z.B. eine eingeschränkte Bildung von GC B-Zellen zustande kam. Für die reduzierte Generierung der GC T_{FH}-Zellen schienen jedoch T-Zell-intrinsische und -extrinsische Effekte eine Rolle zu spielen. Ein T-Zell-intrinsischer Effekt bei fehlender ICOS-Kostimulation konnte auch für den Anteil der transgenen CD62L^{low} Zellen beobachtet werden, der ohne Signale über ICOS erniedrigt war (Daten nicht gezeigt).

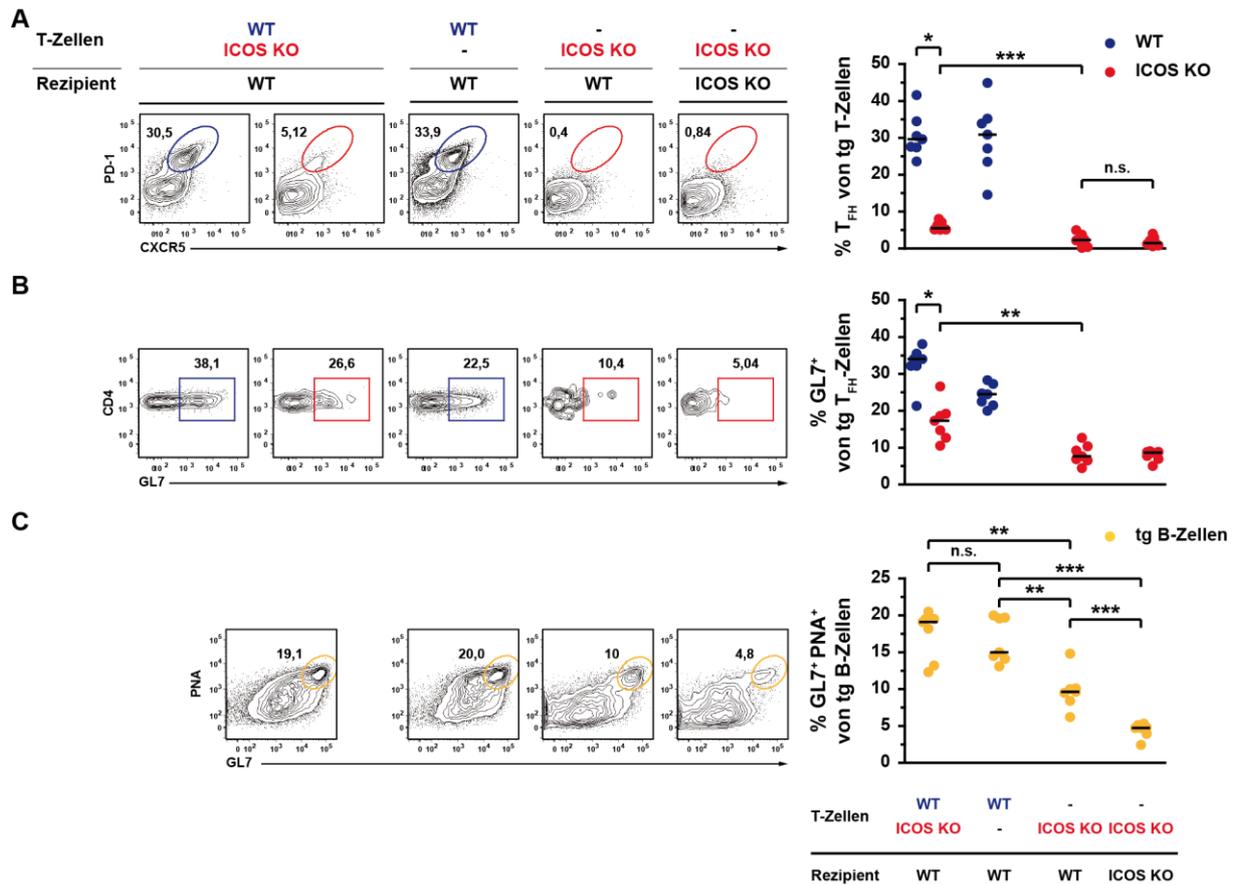


Abb. 19: T-Zell-intrinsische Effekte auf die T_{FH}-Zelldifferenzierung bei fehlender ICOS-Kostimulation.

Es wurden entweder $0,25 \cdot 10^6$ OT-II.WT plus $0,25 \cdot 10^6$ OT-II.ICOS KO T-Zellen zusammen mit $1 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen (CD43⁺ Zellen depletiert) oder $0,5 \cdot 10^6$ OT-II.WT bzw. OT-II.ICOS KO T-Zellen und $1 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen in WT oder ICOS KO Rezipienten transfertiert. Immunisierung mit NP-OVA plus CFA und Analyse der ingLN an Tag 8. Eine Analyse an Tag 0 bestätigte, dass die gleiche Anzahl an transgenen WT und ICOS KO T-Zellen transfertiert wurde (Daten nicht gezeigt). Repräsentative FACS-Plots sind gezeigt. A) Anteil der T_{FH}-Zellen (CXCR5⁺ PD-1⁺) an den transgenen T-Zellen (lebend/CD19⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺ Thy-1.2⁺ (WT) bzw. Thy-1.1⁺ Thy-1.2⁻ (ICOS KO)). B) GC T_{FH}-Zellen: Anteil GL7⁺ von transgenen T_{FH}-Zellen (CXCR5⁺ PD-1⁺). C) GC B-Zellen als Anteil der GL7⁺ PNA⁺ Zellen von den transgenen B-Zellen (lebend/B Lin⁻/CD19⁺/CD45.2⁻/CD45.1⁺). A) & B) Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben für Vergleich der transgenen WT und ICOS KO T-Zellen bei simultanem Transfer, ansonsten Mann-Whitney U-Test. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige (A & C) bzw. ein (B) Experiment(e).

5.4.4 Erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 (IL-2R α) in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation: ein T-Zell-intrinsischer und -extrinsischer Effekt

Der Aktivierungsmarker CD25 ist die IL-2R α -Kette und wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Akdis et al., 2011). In dem erweiterten T/B-Kooperationssystem wurde die Expression von CD25 auf transgenen WT versus ICOS KO T-Zellen untersucht.

Bei dem gleichzeitigen Transfer von transgenen WT und ICOS KO T-Zellen konnte an Tag 8 nach Immunisierung innerhalb der transgenen ICOS KO T-Zellen ein höherer Anteil an CD25⁺ Zellen beobachtet werden als innerhalb der transgenen WT T-Zellen (Abb. 20). Dies korrelierte mit einer erniedrigten Frequenz an transgenen T_{FH}-Zellen (Abb. 19 A). Interessanterweise war der Anteil der

transgenen $CD25^+$ ICOS KO T-Zellen weiter erhöht, wenn keine transgenen WT T-Zellen kotransferiert wurden, und nochmals erhöht, wenn der Transfer in ICOS KO statt WT Rezipienten stattfand (Abb. 20). Dies korrelierte nur im ersten Fall mit einer weiter reduzierten transgenen T_{FH} -Zellfrequenz (Abb. 19 A), aber in beiden Fällen mit einem jeweils verminderten Anteil an transgenen GC B-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass fehlende Signale über ICOS zu einem erhöhten Anteil an $CD25^+$ Zellen in den transgenen T-Zellen führten. Dieser Effekt war aber im Gegensatz zur T_{FH} -Zelldifferenzierung nur teilweise T-Zell-intrinsisch.

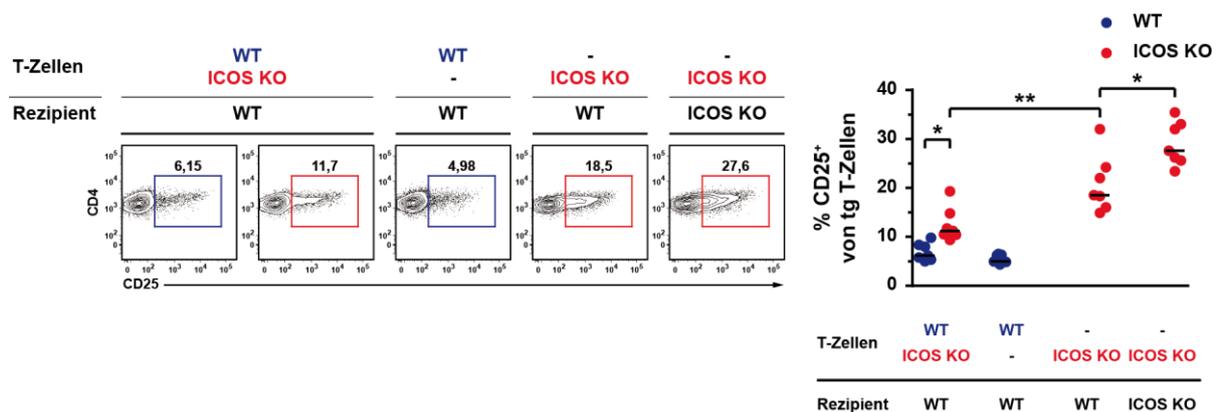


Abb. 20: Anteil der $CD25^+$ Zellen in transgenen WT und ICOS KO T-Zellen im erweiterten T/B-Kooperationssystem.

Es ist dasselbe Experiment wie in Abb. 19 dargestellt. Analyse der ingLN an Tag 8. Repräsentative FACS-Plots sind gezeigt. Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben für Vergleich der transgenen WT und ICOS KO T-Zellen bei gleichzeitigem Transfer, ansonsten Mann-Whitney U-Test. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

5.5 Blockade von ICOS-Signalen zu späten Zeitpunkten: Effekte auf Antigen-spezifische T_{FH} -Zellen und die Keimzentrums-Reaktion

Es konnte gezeigt werden, dass ICOS zu frühen Zeitpunkten keine entscheidende Bedeutung für die T_{FH} -Zelldifferenzierung hat (siehe 5.3). Da zu späteren Zeitpunkten der Immunreaktion (ab Tag 6) allerdings eine stark verminderte Anzahl an T_{FH} -Zellen vorlag, sollte geprüft werden, ob ICOS erst zu späten Zeitpunkten eine wichtige Rolle für die T_{FH} -Zellen einnimmt und für deren Existenz essentiell ist. Deshalb wurde hier der Beitrag der Kostimulation über ICOS für bereits differenzierte T_{FH} -Zellen untersucht, indem die Signaltransduktion über ICOS selektiv zu späten Zeitpunkten blockiert wurde.

5.5.1 Experimenteller Ablauf der späten ICOS-L Blockaden

Da ICOS nur ICOS-L als Liganden besitzt, konnte die Signaltransduktion über ICOS durch die Gabe eines blockierenden anti-ICOS-L-Antikörpers unterbunden werden. Für den verwendeten Klon

MIL-5733 konnte in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass dessen Gabe ab der Immunisierung unter anderem zu einer verminderten Anzahl an T_{FH} -Zellen führte und dementsprechend den Zustand in ICOS KO Tieren nach Immunisierung widerspiegelte.

Neben seiner blockierenden Eigenschaft musste der verwendete anti-ICOS-L-Antikörper auch die Voraussetzung erfüllen, *in vivo* nicht depletierend zu wirken, was nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von $F(ab')_2$ -Fragmenten des anti-ICOS-L-Antikörpers zur ICOS-L Blockade wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht. Da $F(ab')_2$ -Fragmente keinen Fc-Teil besitzen, können diese nicht an Fc-Rezeptoren auf Zellen binden und dadurch unspezifische Effekte ausüben. Aufgrund der geringen Blockade-Aktivität *in vivo* kam der Einsatz von $F(ab')_2$ -Fragmenten aber nicht in Frage (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden für die Antikörper-Applikation die Konzentration des Antikörpers und die Häufigkeit der Gabe getestet. Dabei erwies sich an den ersten beiden Tagen der Blockade eine tägliche Gabe von 150 μ g Antikörper als ideal, die anschließend alle zwei Tage stattfinden konnte (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle zur Applikation des anti-ICOS-L-Antikörpers wurde ein Kontroll-Antikörper mit irrelevanter Spezifität (Klon 1D10) benutzt.

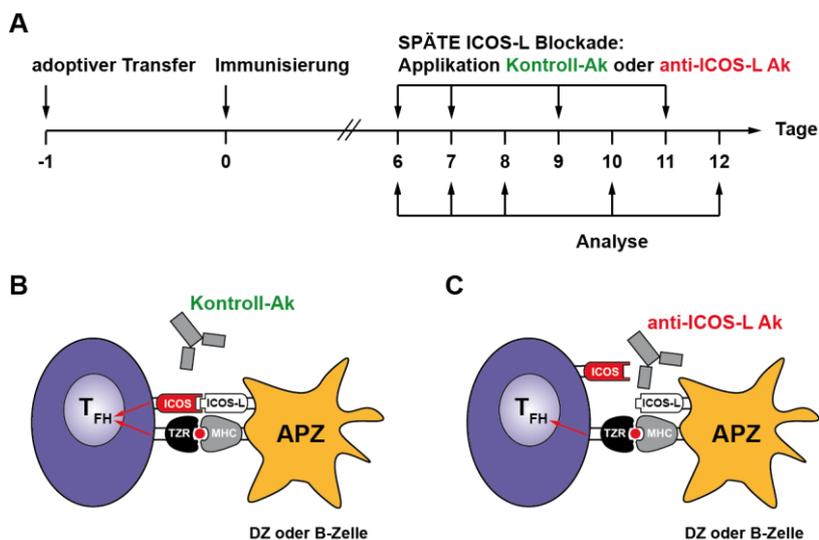


Abb. 21: Zeitlicher Ablauf und Mechanismus der späten ICOS-L Blockade.

A) Für späte ICOS-L Blockaden wurden Antigen-spezifische T- und B-Zellen adoptiv transferiert und die Rezipiententiere am folgenden Tag immunisiert. An Tag 6, 7, 9 und 11 wurden jeweils 150 μ g Kontroll-Antikörper (Ak) (Klon 1D10) oder anti-ICOS-L-Ak (Klon MIL-5733) i.p. appliziert. Die Analyse der drainierenden Lymphknoten (LN) fand an unterschiedlichen Tagen statt. B) Differenzierte T_{FH} -Zellen exprimieren ICOS und können über den TZR sowie durch die Interaktion von ICOS mit ICOS-L auf DZ oder B-Zellen im Keimzentrum Signale erhalten. Der Kontroll-Ak blockiert diese Interaktion nicht. C) Durch die Applikation des anti-ICOS-L-Ak kann eine ICOS-ICOS-L-Interaktion und somit die Signaltransduktion über ICOS in die T_{FH} -Zellen nicht mehr stattfinden.

In Abb. 21 A sind der experimentelle Ablauf der späten ICOS-L Blockade und die Tage der Antikörper-Applikation dargestellt. Alle späten ICOS-L Blockaden begannen an Tag 6, wenn sich die Antigen-spezifischen T-Zellen bereits zu T_{FH} -Zellen differenziert hatten und im B-Zellfollikel neben den Signalen über den TZR auch Signale durch die Interaktion von ICOS mit ICOS-L auf DZ oder

B-Zellen erhielten (Abb. 21 B). Diese Interaktion wurde durch Applikation des anti-ICOS-L-Antikörpers unterbunden (Abb. 21 C).

5.5.2 T_{FH} -Zellen sind 48 h nach später ICOS-L Blockade phänotypisch fast nicht mehr detektierbar

Der Effekt einer späten ICOS-L Blockade auf bereits differenzierte transgene T_{FH} -Zellen wurde ein und zwei Tage nach Applikation des anti-ICOS-L-Antikörpers an Tag 6 analysiert. Die Frequenz sowie die absolute Zellzahl der transgenen T_{FH} -Zellen ($CXCR5^+ PD-1^+$) nahm bereits 24 h nach der Applikation des anti-ICOS-L-Antikörpers ab. 48 h nach Beginn der ICOS-L Blockade besaßen nur noch ~10 % der transgenen T-Zellen den T_{FH} -Zellphänotyp, während es in der Kontroll-Gruppe noch ~40 % waren (Abb. 22 und Daten nicht gezeigt). In anderen – hier nicht gezeigten Experimenten – waren die Effekte noch drastischer und erreichten eine statistische Signifikanz an Tag 8.

Ohne kontinuierliche ICOS-Kostimulation konnten die transgenen T_{FH} -Zellen somit innerhalb von 48 h über CXCR5 und PD-1 kaum noch nachgewiesen werden.

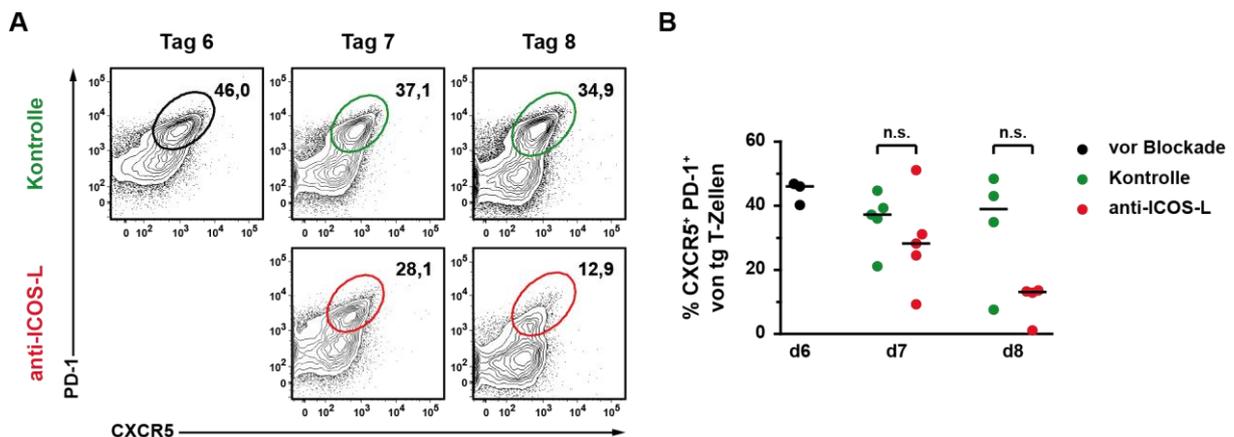


Abb. 22: Frequenz und absolute Zellzahl der transgenen T_{FH} -Zellen nach später ICOS-L Blockade.

Adoptiver Transfer von OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen und Immunisierung mit NP-OVA plus CFA. Kontroll-Ak oder anti-ICOS-L-Ak wurden an Tag 6 und 7 i.p. appliziert. Die ingLN wurden an Tag 7 und 8 analysiert. Die Frequenz der T_{FH} -Zellen ($CXCR5^+ PD-1^+$) ist als Anteil der transgenen T-Zellen (lebend/ $CD19^-/CD4^+/Thy-1.1^+$) dargestellt. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für zwei (Tag 7) bzw. elf (Tag 8) unabhängige Experimente.

5.5.3 Gesamtzellzahl der transgenen T-Zellen bleibt konstant nach später ICOS-L Blockade

Da die Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen nach Blockade der ICOS-Signale über ihren $CXCR5^+ PD-1^+$ -Phänotyp nicht mehr zu detektieren waren, stellte sich die Frage, ob diese Zellen komplett verloren gingen oder noch in dem gesamten transgenen T-Zellpool als $CXCR5^- PD-1^-$ Zellen vorhanden waren und nur ihren $CXCR5^+ PD-1^+$ -Phänotyp verloren. Bei Betrachtung der transgenen T-Zellfrequenz war zwei Tage nach Beginn der Antikörper-Applikation kein Unterschied zwischen den Gruppen, die den

anti-ICOS-L-Antikörper oder den Kontroll-Antikörper erhielten, zu erkennen (Abb. 23 A). Vielmehr war nach der späten ICOS-L Blockade die absolute Zellzahl der transgenen nicht- T_{FH} -Zellen ($CXCR5^- PD-1^-$) erhöht, wobei die absolute Zellzahl der transgenen T_{FH} -Zellen konstant blieb (Abb. 23 B).

Dies deutet darauf hin, dass die transgenen T_{FH} -Zellen nach der Blockade der ICOS-Kostimulation in den transgenen nicht- T_{FH} -Zellpool übergingen und somit weiterhin im gesamten transgenen T -Zellpool enthalten waren.

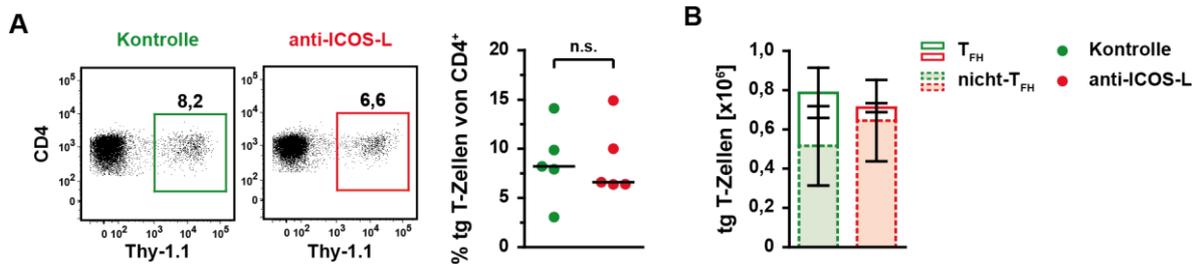


Abb. 23: Frequenz und absolute Zellzahl des gesamten transgenen T-Zellpools zwei Tage nach später ICOS-L Blockade.

Kontroll-Ak- oder anti-ICOS-L-Ak-Applikation (an Tag 6 und 7 i.p.) nach adoptivem Transfer von transgenen OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen und Immunisierung mit NP-OVA plus CFA. Analyse der ingLN an Tag 8. A) Frequenz aller transgenen T-Zellen ($Thy-1.1^+$) bezogen auf $CD4^+$ T-Zellen (lebend/ $CD19^-/CD4^+$). B) Absolute Zellzahl der transgenen $Thy-1.1^+$ T-Zellen unterteilt in nicht- T_{FH} -Zellen ($CXCR5^- PD-1^-$) und T_{FH} -Zellen ($CXCR5^+ PD-1^+$). Es ist der Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes, *standard error of the mean*) dargestellt. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für sechs unabhängige Experimente.

5.5.4 Späte Blockade der ICOS-Kostimulation führt nicht zu erhöhter Apoptose

Für das Überleben von Effektor T-Zellen ist eine Kostimulation über ICOS notwendig; ohne diese Signale war die Apoptoserate von adoptiv transferierten Antigen-spezifischen T-Zellen drei bzw. sechs Tage nach Immunisierung deutlich erhöht (Burmeister et al., 2008). Aus dieser Kenntnis resultierte die Möglichkeit, dass ICOS auch für das Überleben von T_{FH} -Zellen eine wichtige Rolle einnehmen könnte. Deshalb wurde 24 h nach später Blockade des ICOS-Signalweges der Anteil der apoptotischen Zellen innerhalb der Antigen-spezifischen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen analysiert. Früh-apoptotische Zellen wurden mit Hilfe der Annexin V-Färbung nachgewiesen, während in apoptotischen Zellen aktive Caspasen anhand von Caspase-Inhibitoren (hier: FLICA) markiert wurden.

Bereits 24 h nach der Applikation des anti-ICOS-L-Antikörpers waren die Auswirkungen der unterbrochenen ICOS-Signaltransduktion auf die transgenen T_{FH} -Zellen vorhanden, die sich in einer leicht reduzierten Frequenz im Vergleich zur Kontroll-Gruppe widerspiegelten (siehe 5.5.2 und Abb. 24 A). Zu diesem Zeitpunkt konnte aber nach der ICOS-L Blockade weder mit der Annexin V-Färbung noch mit der FLICA-Färbung eine erhöhte Apoptoserate in den transgenen T_{FH} -Zellen beobachtet werden (Abb. 24 B & C). Auch konnte dies nicht für die transgenen nicht- T_{FH} -Zellen

festgestellt werden (Abb. 24 B & C), die ebenfalls eine hohe ICOS-Expression aufwiesen (siehe 5.4.1 und Abb. 16 B & C).

Im Gegensatz zu Effektor T-Zellen, bei denen eine länger anhaltende (über mindestens drei Tage) fehlende ICOS-Kostimulation von Beginn der Aktivierung an zu einer erhöhten Apoptose führte (Burmeister et al., 2008), zeigten Antigen-spezifische T_{FH} -Zellen und nicht- T_{FH} -Zellen keinen Einfluss von ICOS auf das Überleben, wenn ICOS Signale nur kurzfristig (24 h) zu späten Zeitpunkten der Immunreaktion blockiert wurden. Diese Daten unterstützten den Befund aus 5.5.3, dass die transgenen T_{FH} -Zellen nicht aus dem gesamten transgenen T-Zellpool verloren gingen.

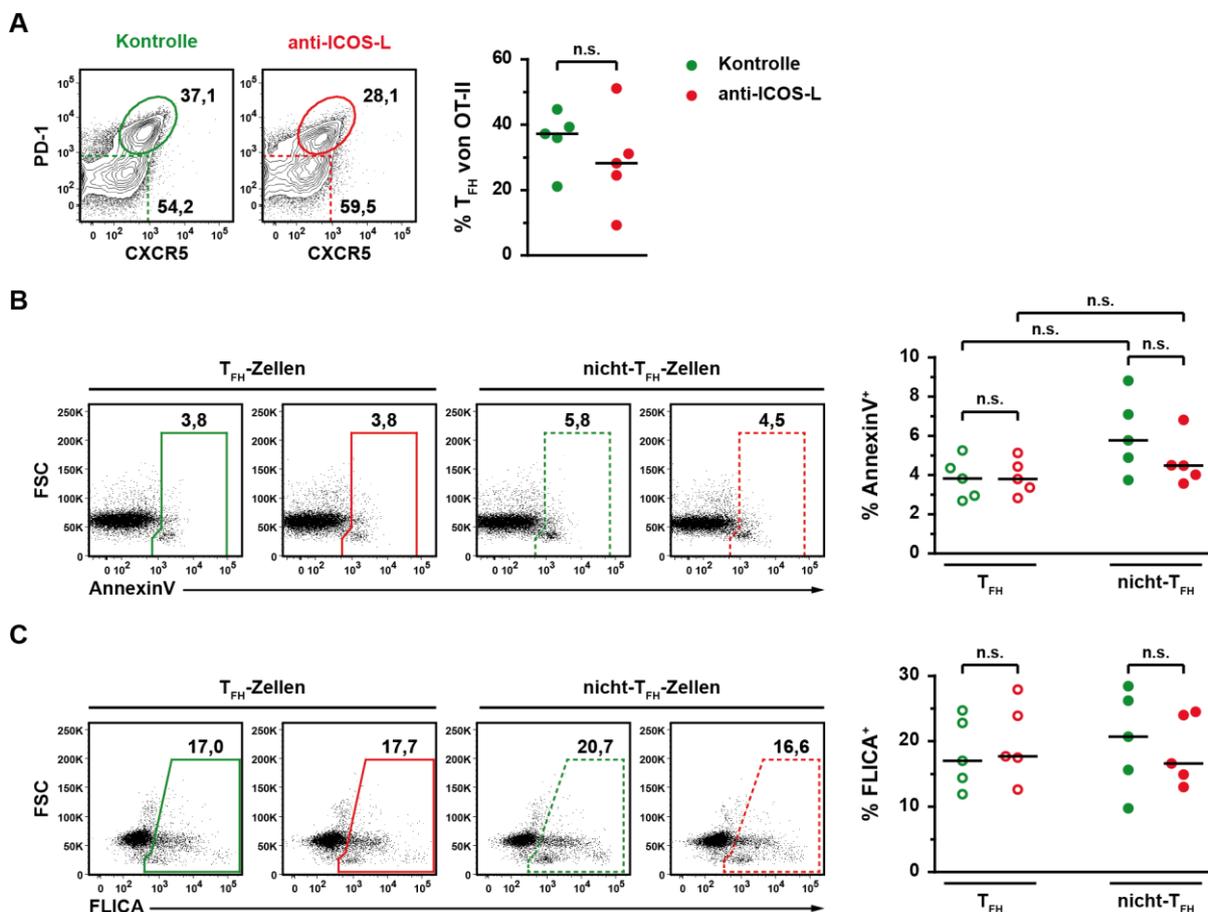


Abb. 24: Messung der Apoptose in transgenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen 24 h nach später ICOS-L Blockade.

Darstellung desselben Experimentes wie Abb. 22: Adoptiver Transfer von OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen in WT Rezipienten und Immunisierung am Folgetag mit NP-OVA plus CFA. Applikation von Kontroll-Ak oder anti-ICOS-L-Ak i.p. an Tag 6 und Analyse der ingLN 24 h später. A) Frequenz der transgenen T_{FH} - ($CXCR5^+ PD-1^+$) und nicht- T_{FH} -Zellen ($CXCR5^- PD-1^-$) als Anteil von den transgenen T-Zellen (lebend/CD19⁺/CD4⁺/Thy-1.1⁺). Die FACS-Plots sind repräsentativ. B) & C) Nachweis früh-apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung (B) bzw. apoptotischer Zellen mittels Caspase-Inhibitoren (FLICA) (C). Repräsentative FACS-Plots sind gezeigt und die prozentualen Anteile beziehen sich auf transgene T_{FH} - bzw. nicht- T_{FH} -Zellen, wie sie in A) definiert sind. Verwendung des Mann-Whitney U-Tests für den Vergleich der anti-ICOS-L- und Kontroll-Gruppe. Für den Vergleich der T_{FH} - mit den nicht- T_{FH} -Zellen wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben angewendet.

5.5.5 Transgene T_{FH}-Zellen sind auch anhand weiterer T_{FH}-Zell-spezifischer Marker nach später ICOS-L Blockade nicht mehr nachweisbar

Da die Expression von PD-1 zu frühen Zeitpunkten von ICOS reguliert wurde (siehe 5.3.3), war es denkbar, dass PD-1 auch durch die Blockade der ICOS-Kostimulation zu späten Zeitpunkten reguliert wurde und somit keinen optimalen Marker für die Definition der T_{FH}-Zellen darstellen würde. Deshalb wurden hier die T_{FH}-Zellen nach später ICOS-L Blockade über weitere Marker neben CXCR5 und PD-1 definiert: über den Mastertranskriptionsfaktor BCL-6, TIGIT und CCR7. Während TIGIT selektiv auf T_{FH}-Zellen exprimiert wird (Boles et al., 2009), ist der Chemokinrezeptor CCR7 auf diesen runterreguliert (Ansel et al., 1999; Hardtke et al., 2005; Haynes et al., 2007). Auch in dem verwendeten adoptiven Transfersystem konnte gezeigt werden, dass TIGIT selektiv auf T_{FH}-Zellen, aber nicht auf nicht-T_{FH}-Zellen exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Frequenz der transgenen T_{FH}-Zellen wurde an zwei, vier und sechs Tagen nach später ICOS-L Blockade als Anteil der CXCR5⁺ PD-1⁺, CXCR5⁺ BCL-6⁺, PD-1⁺ CCR7⁻ oder TIGIT⁺ Zellen an den transgenen T-Zellen angegeben. Unabhängig von der Definition der T_{FH}-Zellen über die unterschiedlichen Marker war die Frequenz der transgenen T_{FH}-Zellen zwei Tage nach Beginn der Blockade bereits sehr deutlich auf ~10 bis 15 % reduziert (Abb. 25 A & C). Diese reduzierte sich im weiteren Verlauf, so dass sechs Tage nach Beginn der späten ICOS-L Blockade fast gar keine transgenen T_{FH}-Zellen mehr detektiert werden konnten (Abb. 25 B & C). Dennoch war an Tag 12 noch eine gut abgegrenzte und distinkte transgene T_{FH}-Zellpopulation zu erkennen (Abb. 25 B). Für die absolute Zellzahl der transgenen T_{FH}-Zellen war der gleiche Effekt zu beobachten wie für die Frequenzen (Abb. 25 D). Die jeweils geringeren Frequenzen der transgenen T_{FH}-Zellen beim *Gating* über CXCR und BCL-6 im Vergleich zum *Gating* über CXCR5 und PD-1 oder PD-1 und CCR7 kommt durch die relativ schwache BCL-6-Färbung zustande, welche zu einer schlechteren Abtrennung der T_{FH}-Zellpopulation im *Dot Plot* führt.

Da neben einigen T_{FH}-Zell-spezifischen Markern auch der Mastertranskriptionsfaktor BCL-6 von den transgenen T-Zellen nach der Unterbrechung der ICOS-Kostimulation nicht mehr exprimiert wurde, konnte hier eindeutig nachgewiesen werden, dass die transgenen T_{FH}-Zellen nach der späten ICOS-L Blockade ihren Phänotyp komplett verloren hatten. Dieser Effekt war auch noch sechs Tage nach Beginn der Blockade zu erkennen.

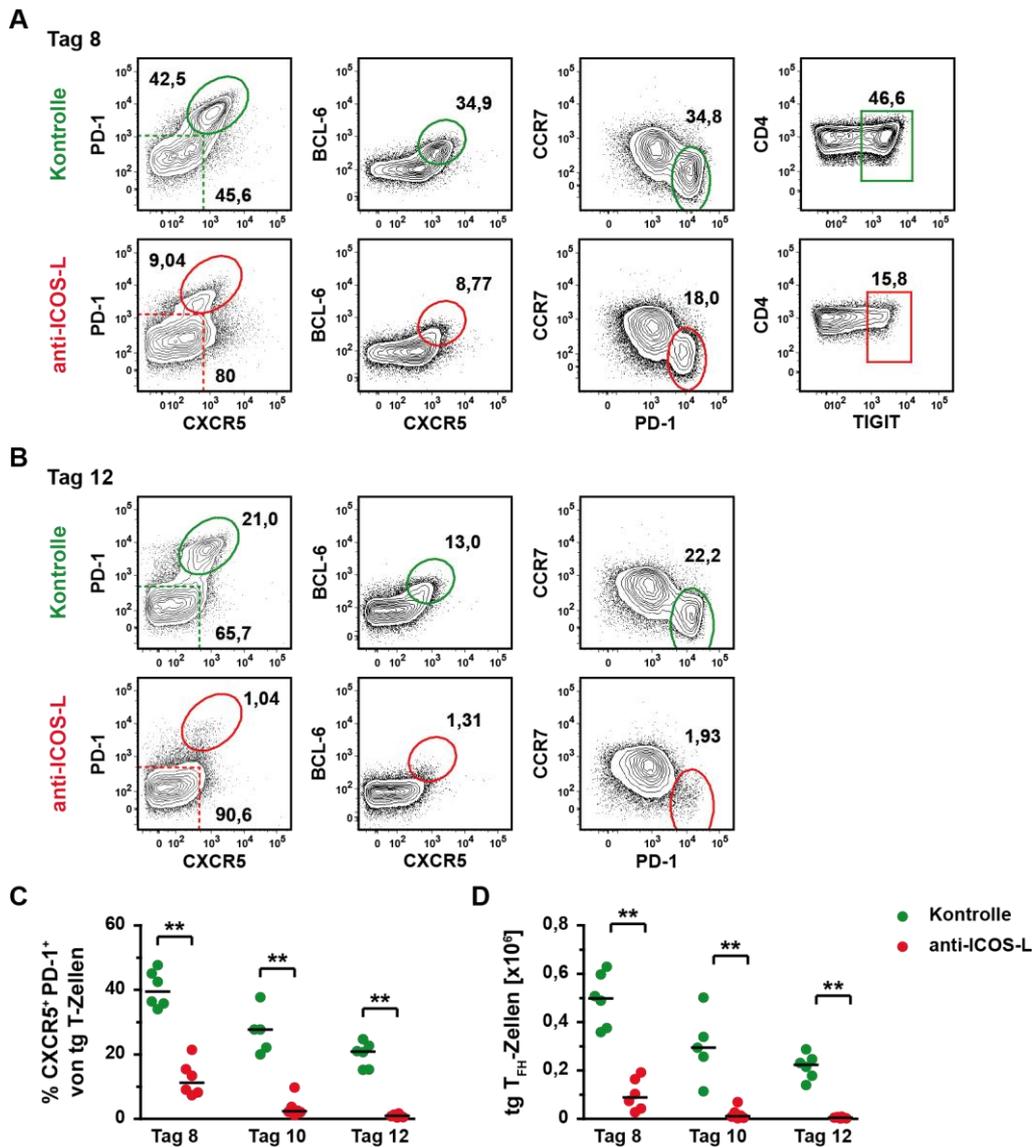


Abb. 25: Transgene T_{FH} -Zellen sind über CXCR5, PD-1, CCR7 und BCL-6 nach später ICOS-L Blockade nicht mehr detektierbar.

Adoptiver Transfer von OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen in WT Rezipienten und Immunisierung mit NP-OVA plus CFA am folgenden Tag. Applikation von Kontroll-Ak oder anti-ICOS-L-Ak i.p. an Tag 6, 7, 9 und 11. A) & B) T_{FH} -Zellen wurden als $CXCR5^+ PD-1^+$, $CXCR5^+ BCL-6^+$, $PD-1^+ CCR7^+$ oder $TIGIT^+$ definiert. Die prozentualen Anteile beziehen sich auf transgene T-Zellen (lebend/ $CD19^+ / CD4^+ / Thy-1.1^+$). Repräsentative FACS-Plots für die Frequenzen der transgenen T_{FH} -Zellen zwei (A) bzw. sechs (B) Tage nach Beginn der ICOS-L Blockade. C) & D) Frequenz (C) bzw. absolute Zellzahl (D) der transgenen T_{FH} -Zellen ($CXCR5^+ PD-1^+$). Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für ein bis drei Experimente mit jeweils $n = 5$ bis 6 Tieren pro Gruppe.

5.5.6 Nach Blockade des ICOS-Signalweges revertieren die transgenen T_{FH} -Zellen zu nicht- T_{FH} -Zellen

In den vorangehenden Abschnitten konnte aufgrund der konstant bleibenden transgenen Gesamt-T-Zellzahl und der nicht erhöhten Apoptoserate in den transgenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen gezeigt werden, dass die Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen bei Unterbrechung der ICOS-Kostimulation offensichtlich in den nicht- T_{FH} -Zellpool übergangen. Um die Hypothese zu untermauern, dass die transgenen T_{FH} -Zellen nach Blockade der ICOS-Signale tatsächlich ihren Phänotyp hin zu einem nicht- T_{FH} -Zellphänotyp veränderten, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Blockade einige typische T_{FH} -Zellmarker auf den transgenen T_{FH} -Zellen analysiert.

Zwei Tage nach später ICOS-L Blockade (Tag 8) besaßen noch ~10 % der transgenen T-Zellen einen T_{FH} -Zellphänotyp, der vier und sechs Tage nach Blockade (Tag 10 und 12) kaum noch nachzuweisen war (siehe Abb. 25 und 5.5.5). Zwei Tage nach Blockade (Tag 8) konnte innerhalb der verbliebenen transgenen T_{FH} -Zellen (hier als $CXCR5^+ PD-1^+$ definiert) eine signifikant erniedrigte Expression des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 festgestellt werden, die vier und sechs Tage nach Blockade (Tag 10 und 12) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe unverändert war (Abb. 26 A). Auch CXCR5 und PD-1, die zur Identifikation der T_{FH} -Zellen verwendet wurden, waren zwei Tage nach Unterbrechung der ICOS-Kostimulation signifikant runterreguliert, während CCR7 stärker exprimiert wurde (Abb. 26 B, C & D). An den anderen untersuchten Tagen wurde nur CXCR5 vier Tage nach der Blockade (Tag 10) auf den sehr wenigen verbliebenen T_{FH} -Zellen schwächer exprimiert als nach Applikation des Kontroll-Antikörpers (Abb. 26 B & C). Für TIGIT hingegen konnte zwei Tage nach der späten ICOS-L Blockade (Tag 8) kein Unterschied in der Expression auf den transgenen T_{FH} -Zellen festgestellt werden (Abb. 26 E).

Zwei Tage nach Blockade der ICOS-Signale befanden sich die transgenen T_{FH} -Zellen noch in dem Prozess, ihren T_{FH} -Zellphänotyp ($CXCR^+ PD-1^+$ bzw. $CXCR5^+ BCL-6^+$ bzw. $PD-1^+ CCR7^+$) zu verlieren; ihre Frequenz und absolute Zellzahl sank an den folgenden Tagen noch weiter ab (siehe Abb. 25). Die Tatsache, dass die zu diesem Zeitpunkt (Tag 8) noch verbliebenen T_{FH} -Zellen die Expression ihres Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 sowie der T_{FH} -Zell-spezifischen Marker CXCR5 und PD-1 erniedrigten und zur gleichen Zeit CCR7 hochregulierten, deutet darauf hin, dass die transgenen T_{FH} -Zellen ohne anhaltende ICOS-Kostimulation ihren T_{FH} -Zellphänotyp nicht aufrechterhalten konnten und zu nicht- T_{FH} -Zellen revertierten.

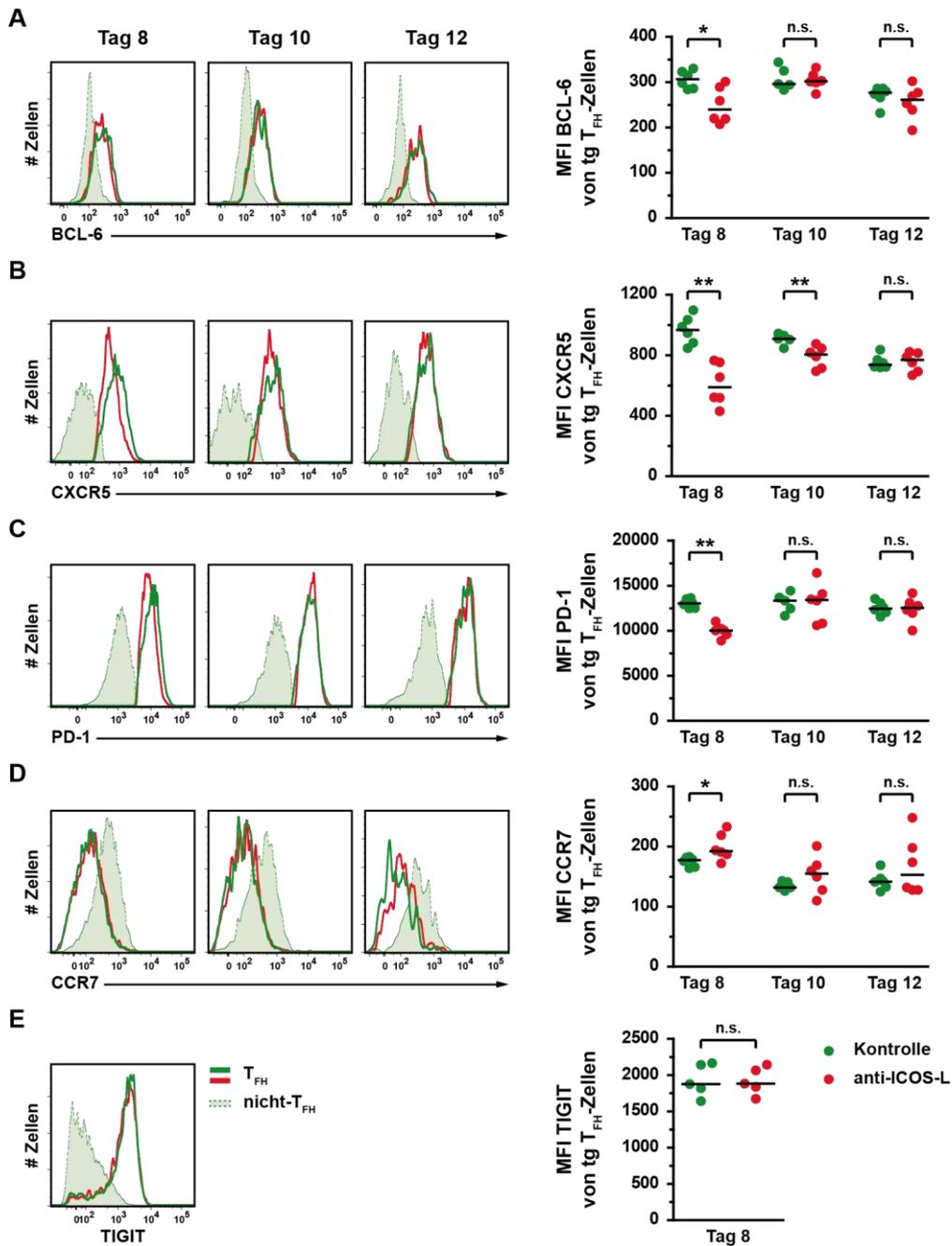


Abb. 26: Expression T_{FH}-Zell-spezifischer Marker nach später ICOS-L Blockade.

OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen (CD43⁺ Zellen depletiert) wurden in WT Rezipienten transferriert und diese anschließend mit NP-OVA plus CFA immunisiert. An Tag 6, 7, 9 und 11 wurden Kontroll-Ak oder anti-ICOS-L-Ak i.p. appliziert. Es ist dasselbe Experiment wie in Abb. 25 gezeigt. Der MFI von BCL-6 (A), CXCR5 (B), PD-1 (C), CCR7 (D) und TIGIT (E) auf transgenen T_{FH}-Zellen (lebed/CD19⁺/CD4⁺/Thy-1.1⁺/CXCR5⁺PD-1⁺) zu den angegebenen Zeitpunkten ist dargestellt. Die Histogramm-Überlagerungen sind repräsentativ und zeigen die Expression in transgenen T_{FH}-Zellen nach Kontroll-Ak bzw. anti-ICOS-L-Ak-Applikation sowie in transgenen nicht-T_{FH}-Zellen (CXCR5⁻PD-1⁻) nach Kontroll-Ak-Applikation.

5.5.7 Erhöhte ICOS-Expression auf Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen nach Blockade der ICOS-Kostimulation

Antigen-spezifische T-Zellen wiesen nach adoptivem Transfer und Immunisierung der Rezipiententiere in Abwesenheit von ICOS-L eine erhöhte Expression von ICOS auf. Dieser Effekt konnte zu frühen (Tag 4) als auch späten Zeitpunkten (Tag 6 bis 8) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ob die Unterbrechung der ICOS-ICOS-L-Interaktion zu späten Zeitpunkten auch zu einer Hochregulation von ICOS auf Antigen-spezifischen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen führte, wurde hier analysiert.

24 h nach Blockade der ICOS-Signale konnte noch kein Unterschied in der Expressionsstärke von ICOS auf den transgenen T_{FH}-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ab zwei Tage nach Blockade-Beginn war eine erhöhte ICOS-Expression auf den transgenen T_{FH}-Zellen, aber nicht auf den transgenen nicht-T_{FH}-Zellen zu erkennen (Abb. 27 und Daten nicht gezeigt). Dennoch war die ICOS-Expression in den transgenen T_{FH}-Zellen zwei Tage nach später ICOS-L Blockade noch geringer als in transgenen T_{FH}-Zellen der ICOS-L KO Gruppe, in der keine ICOS-Kostimulation von Beginn der Immunreaktion an stattfand.

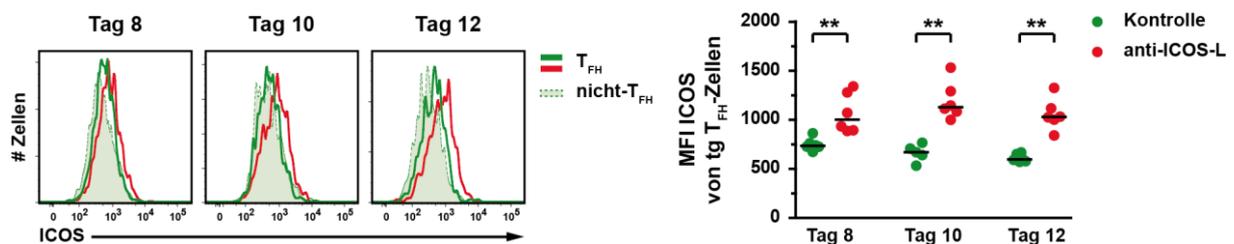


Abb. 27: ICOS-Expression auf transgenen T_{FH}-Zellen nach später Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion.

Adoptiver Transfer von OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen (CD43⁺ Zellen depletiert). Die Rezipiententiere wurden mit NP-OVA plus CFA immunisiert, und an Tag 6, 7, 9 und 11 wurde Kontroll-Ak oder anti-ICOS-L-Ak i.p. appliziert. Es ist dasselbe Experiment wie in Abb. 25 und Abb. 26 dargestellt. ICOS wurde mit dem hochaffinen Klon MIC-2043 gefärbt. Der MFI von ICOS ist für transgene T_{FH}-Zellen (lebend/CD19⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺/CXCR5⁺ PD-1⁺) angegeben. Das Histogramm zeigt eine repräsentative Überlagerung der ICOS-Expression von transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen nach Kontroll-Ak- oder anti-ICOS-L-Ak-Applikation. Das Experiment ist repräsentativ für zwei (Tag 8) bzw. ein (Tag 10 und 12) Experiment(e).

5.5.8 IL-21-Produktion der transgenen T_{FH}-Zellen ist nach Blockade der ICOS-Signale reduziert

T_{FH}-Zellen produzieren eine hohe Menge IL-21, um ihre Effektorfunktion auszuüben (Crotty, 2011). Da die transgenen T_{FH}-Zellen nach Blockade der ICOS-Signale zu einem nicht-T_{FH}-Zellphänotyp revertierten, wurde hier die Auswirkung der Blockade auf die Effektorfunktion der verbliebenen transgenen T_{FH}-Zellen sowie der transgenen nicht-T_{FH}-Zellen untersucht. Um die IL-21-Produktion zu analysieren, wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin *in vitro* restimuliert. IL-21 wurde hier mit

einem chimären IL-21R-Fc-Protein gefärbt; die Spezifität der Färbung ist in Abb. 28 D anhand von unstimulierten Zellen zu erkennen.

An Tag 8 nach Immunisierung produzierten ~95 % der transgenen T_{FH} -Zellen IL-21. Überraschenderweise konnte auch innerhalb der transgenen nicht- T_{FH} -Zellen ein recht hoher Anteil an IL-21-Produzenten von ~75 % nachgewiesen werden (Abb. 28 A & B, jeweils Kontroll-Gruppe). Wie in 5.4.1 erwähnt, zeigen die transgenen Antigen-spezifischen nicht- T_{FH} -Zellen eine höhere Aktivierung in Form von erhöhter PD-1-, ICOS- und BCL-6- sowie erniedrigter CCR7-Expression im Vergleich zu den endogenen nicht- T_{FH} -Zellen. Letztere wiesen nur einen Anteil von ~1,5 % IL-21⁺ Zellen auf (Daten nicht gezeigt). Von den endogenen T_{FH} -Zellen, die eine sehr hohe ICOS-Expression besaßen (siehe Abb. 16 und 5.4.1), produzierten hingegen ~60 % IL-21 (Daten nicht gezeigt). In Abb. 28 C ist die IL-21-Produktion von allen endogenen T-Zellen im Vergleich mit den transgenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen dargestellt.

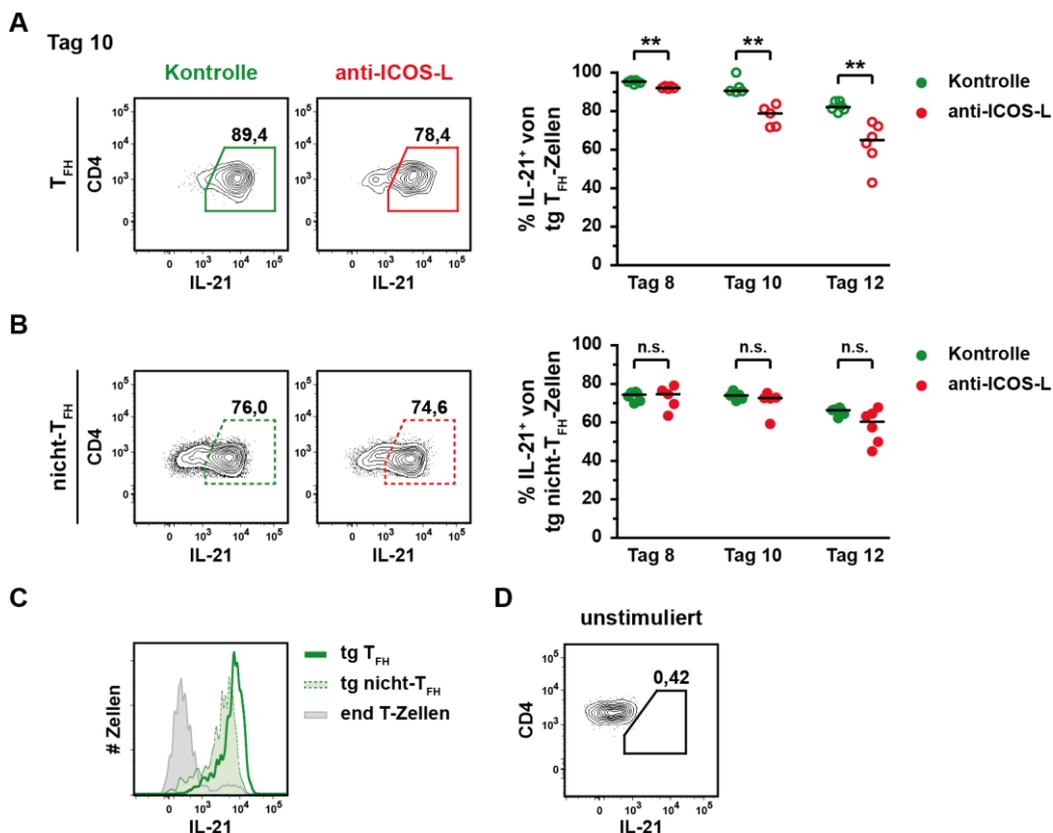


Abb. 28: IL-21-Produktion von transgenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen nach später ICOS-L Blockade.

OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen (CD43⁺ Zellen depletiert) wurden in WT Rezipienten transferiert und diese mit NP-OVA plus CFA immunisiert. ICOS-Kostimulation wurde durch i.p. Applikation von anti-ICOS-L-Ak an Tag 6, 7, 9 und 11 blockiert. Als Kontrolle wurde Kontroll-Ak appliziert. Es ist dasselbe Experiment wie in Abb. 25, Abb. 26 und Abb. 27 dargestellt. Die Zellen wurden mit PMA/Ionomycin *in vitro* restimuliert und IL-21 mit einem chimären IL-21R-Fc-Protein gefärbt. A) & B) Repräsentative FACS-Plots zeigen die IL-21-Produktion von transgenen T_{FH} - (lebend/CD19⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺/CXCR5⁺ PD-1⁺) (A) und nicht- T_{FH} -Zellen (lebend/CD19⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺/CXCR5⁻ PD-1⁻) (B) an Tag 10. C) Repräsentatives Histogramm an Tag 10 zeigt die IL-21-Produktion in endogenen T-Zellen sowie transgenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen der Kontroll-Gruppe und verdeutlicht die Spezifität der IL-21-Färbung. D) IL-21-Färbung auf transgenen T_{FH} -Zellen ohne PMA/Ionomycin-Restimulation *in vitro* an Tag 12 (Kontroll-Gruppe).

Bereits zwei Tage nach der späten Blockade der ICOS-Kostimulation war der Anteil der IL-21-Produzenten selektiv innerhalb des transgenen T_{FH} -Zellpools verringert und verminderte sich weiter bis sechs Tage nach Beginn der Blockade. Auch in den sehr wenigen verbliebenen T_{FH} -Zellen vier und sechs Tage nach Applikation des anti-ICOS-L-Antikörpers waren aber noch ~75 % bzw. ~65 % IL-21-Produzenten vorhanden (Abb. 28 A). Somit entsprach der Anteil der IL-21-Produzenten der verbliebenen transgenen T_{FH} -Zellen sechs Tage nach Blockade-Beginn in etwa dem Anteil der IL-21-Produzenten in den transgenen nicht- T_{FH} -Zellen der Kontroll-Gruppe (~60 % IL-21⁺) (Abb. 28 A & B). Der Anteil der IL-21-Produzenten innerhalb der transgenen nicht- T_{FH} -Zellen blieb zu allen analysierten Zeitpunkten während der Antikörper-Applikation unverändert (Abb. 28 B). Demnach verloren die transgenen T_{FH} -Zellen nach ihrem Übergang in den nicht- T_{FH} -Zellpool auch ihren T_{FH} -Zellphänotyp hinsichtlich ihrer Fähigkeit, IL-21 zu produzieren, da ansonsten der Anteil der IL-21⁺ Zellen in den transgenen nicht- T_{FH} -Zellen nach ICOS-L Blockade erhöht gewesen wäre. Nach Blockade der ICOS-Signale in differenzierten transgenen T_{FH} -Zellen verminderten sowohl die verbliebenen als auch die zu nicht- T_{FH} -Zellen revertierten transgenen T_{FH} -Zellen ihre Fähigkeit, IL-21 zu produzieren, und zwar auf das Niveau der transgenen nicht- T_{FH} -Zellen.

5.5.9 Verminderte Frequenz an Antigen-spezifischen B-Zellen und GC B-Zellen nach später Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion

T_{FH} -Zellen sowie das von ihnen produzierte IL-21 sind essentiell für die Ausbildung Antigen-spezifischer Keimzentren (Crotty, 2011; Ma et al., 2012). Da die Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen innerhalb von zwei Tagen nach der späten Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion fast vollständig ihren Phänotyp verloren und weniger IL-21-Produzenten innerhalb der verbliebenen T_{FH} -Zellpopulation vorhanden waren, stellte sich die Frage, ob auch die Keimzentrums-Reaktion dadurch beeinträchtigt wird. Im T/B-Kooperationssystem wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach später ICOS-L Blockade die Frequenz der transgenen Antigen-spezifischen B-Zellen und der Anteil der transgenen GC B-Zellen und klassengewechselten B-Zellen analysiert.

Die Frequenz sowie die absolute Zellzahl der transgenen B-Zellen war zwei Tage nach Beginn der ICOS-L Blockade noch unverändert und erst ab vier Tage nach Blockade-Beginn reduziert (Tag 10); dieser Unterschied war allerdings erst nach sechs Tagen (Tag 12) signifikant (Abb. 29 A und Daten nicht gezeigt).

GC B-Zellen konnten über eine GL7- und PNA-Färbung, aber auch über die Färbung ihres Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 identifiziert werden. Die BCL-6-Expression in den transgenen B-Zellen korrelierte mit der GL7-Färbung sowie mit einer Runterregulation von CD38, die für GC B-Zellen und Plasmazellen bekannt ist (Abb. 29 B). Ebenso wie für die absolute Zellzahl der transgenen B-Zellen war der Anteil der GC B-Zellen (GL7⁺ PNA⁺, BCL-6⁺ GL7⁺ oder BCL-6⁺ CD38⁻) innerhalb der transgenen B-Zellen zu Beginn der ICOS-L Blockade noch unbeeinträchtigt und erst nach vier Tagen (Tag 10) leicht und nach sechs Tagen (Tag 12) deutlich und signifikant reduziert

(Abb. 29 B). In Kombination mit der verringerten transgenen B-Zellfrequenz war somit die absolute Zellzahl der Antigen-spezifischen GC B-Zellen sechs Tage nach Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion drastisch reduziert (Tag 12) (Daten nicht gezeigt). Die Expressionsstärke des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 auf den transgenen GC B-Zellen war an Tag 12 nur leicht reduziert (Abb. 29 C). Dies weist darauf hin, dass die verbliebenen GC B-Zellen die Möglichkeit besaßen, ihre volle Funktion auszuüben.

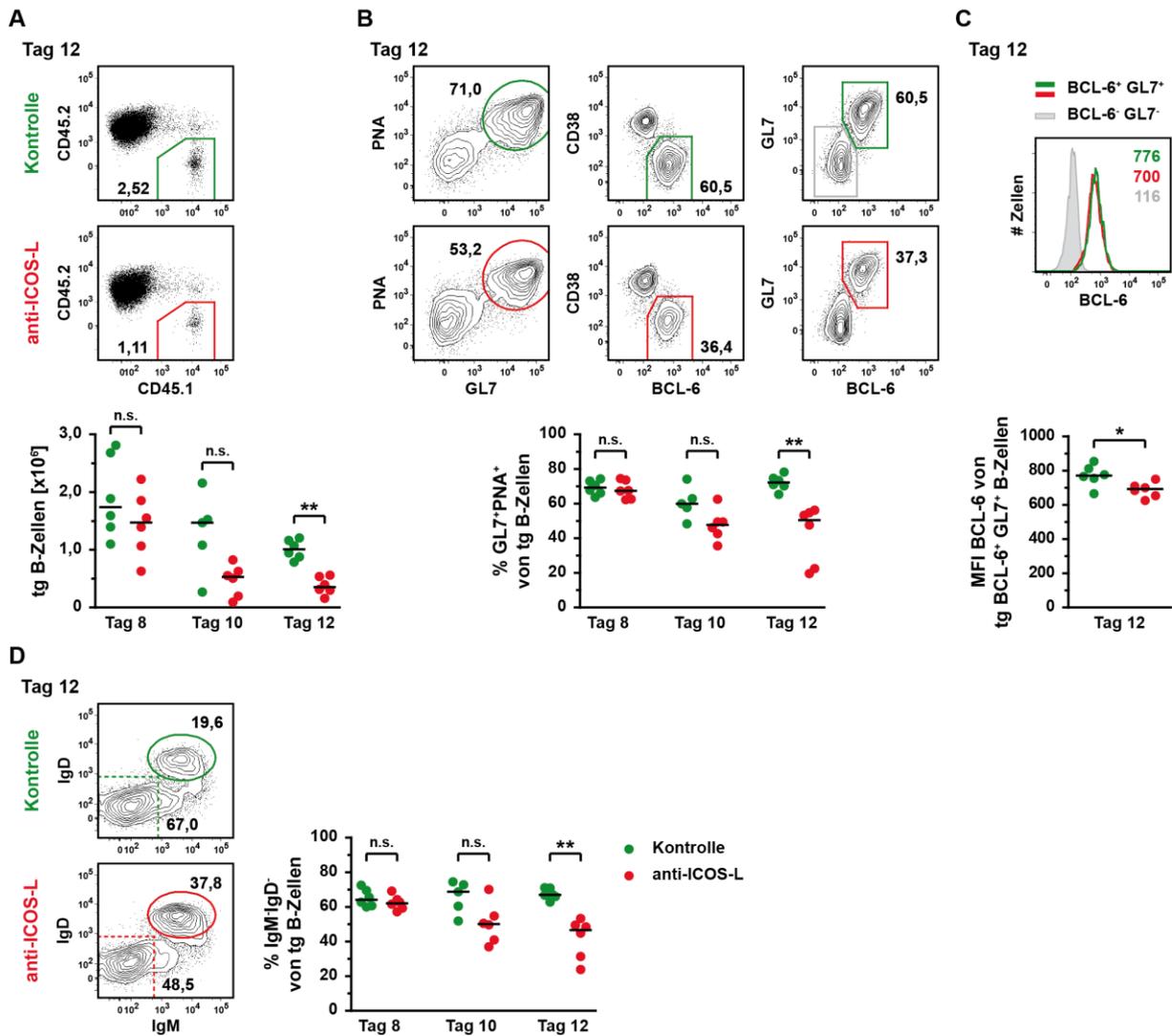


Abb. 29: Effekte der späten Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion auf die transgenen B-Zellen.

Adoptiver Transfer von OT-II T-Zellen und B1-8i B-Zellen (CD43⁺ Zellen depletiert) in WT Rezipienten und Immunisierung mit NP-OVA plus CFA. Kontroll-Ak oder anti-ICOS-L-Ak wurden an Tag 6, 7, 9 und 11 i.p. appliziert. Darstellung desselben Experiments wie in Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27 und Abb. 28. A), B) & D) Repräsentative FACS-Plots zeigen den Anteil der transgenen B-Zellen (CD45.1⁺ CD45.2⁺) von B-Zellen (lebend/B Lin⁻/CD19⁺) (A) bzw. den Anteil der GC B-Zellen (B) oder klassengewechselten (IgM⁻ IgD⁻) sowie naiven (IgM⁺ IgD⁺) B-Zellen (D) bezogen auf die transgenen B-Zellen an Tag 12. C) MFI von BCL-6 auf transgenen BCL-6⁺ GL7⁺ GC B-Zellen nach Kontroll-Ak- oder anti-ICOS-L-Ak-Applikation. Im Histogramm Überlagerung mit transgenen BCL-6⁻ GL7⁺ B-Zellen nach Kontroll-Ak-Applikation. Die Zahlen im Plot geben den MFI an. Das Experiment ist repräsentativ für sechs (Tag 8) bzw. ein bis zwei (Tag 10 und 12) unabhängige Experimente.

Auch der Anteil der transgenen klassengewechselten B-Zellen (IgM⁻ IgD⁻) war erst vier Tage nach Beginn der anti-ICOS-L-Antikörper-Applikation leicht (Tag 10) und nach sechs Tagen (Tag 12) signifikant reduziert. Der Anteil der transgenen naiven (IgM⁺ IgD⁺) B-Zellen war dagegen erst nach sechs Tagen signifikant erhöht (Abb. 29 D und Daten nicht gezeigt).

Die Unterbrechung der ICOS-ICOS-L-Interaktion zu späten Zeitpunkten der Immunreaktion wirkte sich im Gegensatz zu den transgenen T_{FH}-Zellen (reduzierte Frequenzen bereits nach 24 h) erst recht spät (nach vier Tagen) auf die transgenen B-Zellen aus. Vergleicht man allerdings die Effekte der späten ICOS-L Blockade mit denen in der ICOS-L KO Gruppe, in der während der gesamten Immunreaktion keine ICOS-Kostimulation stattfinden kann, so war hier der Anteil der transgenen GC B-Zellen und klassengewechselten B-Zellen zwar vermindert, aber noch deutlich höher als in der ICOS-L KO Situation (Daten nicht gezeigt). Die Antigen-spezifischen Keimzentren blieben demzufolge auch ohne das Vorhandensein von transgenen T_{FH}-Zellen noch zum Teil erhalten.

5.5.10 Sortierung transgener T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen 6 h nach später ICOS-L Blockade

Wie in den vorangehenden Abschnitten dargestellt wurde, spielt ICOS eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des T_{FH}-Zellphänotyps zu späten Zeiten der Immunreaktion. Bisher ist allerdings nicht bekannt, welche Signale genau entscheidend sind. Aus diesem Grund wurden die transgenen T_{FH}-Zellen kurz nach der Blockade der ICOS-Kostimulation oder der Kontroll-Antikörper-Applikation sortiert, um eine umfassende Transkriptom-Analyse mittels Microarrays durchzuführen. Da 24 h nach der Antikörper-Applikation bereits die Auswirkungen der fehlenden ICOS-Kostimulation in Form von reduzierten transgenen T_{FH}-Zellfrequenzen zu erkennen waren (siehe 5.5.2), wurde ein sehr früher Zeitpunkt für die Sortierung gewählt: 6 h nach der ICOS-L Blockade war die Frequenz und der Phänotyp der transgenen T_{FH}-Zellen noch fast unverändert – die Frequenz sowie der MFI für CXCR5 und PD-1 waren nur minimal reduziert (Daten nicht gezeigt). Zu diesem frühen Zeitpunkt sollten außerdem ICOS-abhängige Unterschiede in der Genexpression auf mRNA-Ebene bereits zu erkennen sein. Die Wahl eines so frühen Zeitpunkts sollte zudem gewährleisten, dass möglichst direkte Ziele der ICOS-Signaltransduktion identifiziert werden können. Zusätzlich wurden auch die transgenen nicht-T_{FH}-Zellen sortiert, um deren RNA in der *realtime*-RT-PCR zu untersuchen (5.5.12).

Eine Sortierungsstrategie für transgene T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen war noch nicht etabliert, wurde aber an die Sortierungsstrategie von transgenen T-Zellen (siehe 5.3.1) angelehnt. Die transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen wurden zunächst über ihren kongenen Marker Thy-1.1 mit Hilfe von MACS vorangereichert, dann am Durchflusszytometer anhand von Thy-1.1, CXCR5 und PD-1 zu hoher Reinheit sortiert (Abb. 30) und anschließend deren RNA isoliert.

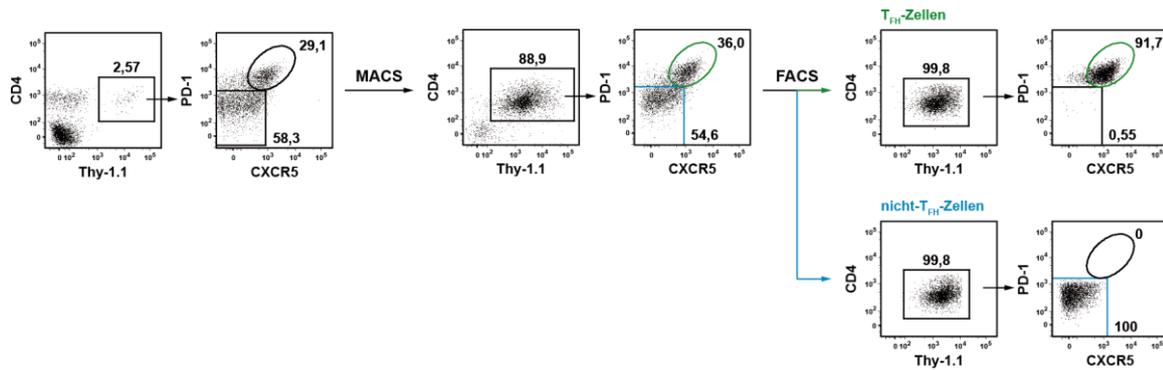


Abb. 30: Sortierungsstrategie für transgene T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen.

OT-II T-Zellen ($0,5 \cdot 10^6$ Zellen) und B1-8i B-Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen) wurden adoptiv in WT Rezipienten (Thy-1.2⁺) transferriert. Die Immunisierung erfolgte mit NP-OVA plus CFA. Transgene (Thy-1.1⁺) T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen wurden 6 h nach Applikation von Kontroll-Ak oder anti-ICOS-L-Ak über Thy-1.1 mittels MACS vorangereicht. Transgene T_{FH} -Zellen wurden als lebend/B220⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺/CXCR5⁺ PD-1⁺ und transgene nicht- T_{FH} -Zellen als lebend/B220⁻/CD4⁺/Thy-1.1⁺/CXCR5⁻ PD-1⁻ durchflusszytometrisch sortiert. Die Reinheit betrug mindestens 91,3 % bzw. 99,6 % aller lebenden Zellen. Die Zahlen in den Plots geben die Frequenz der transgenen T-Zellen von lebend bzw. die Frequenz der transgenen T_{FH} - bzw. nicht- T_{FH} -Zellen bezogen auf die transgenen T-Zellen an.

5.5.11 Transkriptom-Analyse der transgenen T_{FH} -Zellen 6 h nach Blockade der ICOS-Kostimulation

Für die Transkriptom-Analyse wurde die RNA von transgenen T_{FH} -Zellen, die 6 h nach Applikation eines anti-ICOS-L- oder Kontroll-Antikörpers sortiert wurden (siehe 5.5.10), aus zwei unabhängigen Experimenten eingesetzt. Es wurde das *GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array* (Affymetrix) verwendet, mit dem die Expression von 39.000 mRNA-Transkripten analysiert werden konnte (siehe 5.3.1).

Es konnten ~1.000 Gene identifiziert werden, die durch Blockade der ICOS-Signale in den transgenen T_{FH} -Zellen auf mRNA-Ebene signifikant differentiell reguliert wurden. Davon waren ~660 Gene signifikant hoch- und ~340 Gene signifikant runterreguliert. Die Veränderung der Expressionsstärke lag zwischen +4,2- und -2,5-fach und der HPCDA-Score, der für signifikant regulierte Gene die Relevanz der differentiellen Veränderung angibt, betrug maximal 972. Insgesamt konnte keine hohe Veränderung der Genexpression durch die Blockade der ICOS-Signale 6 h nach Antikörper-Applikation beobachtet werden. Die nach ICOS-L Blockade in den transgenen T_{FH} -Zellen am stärksten hochregulierten Gene waren *Itga7* (+2,98), *Bach2* (+2,73), *Gzma* (+2,46), *Klf2* (+2,26) und *Igf1r* (+2,22), die am stärksten runterregulierten Gene *Cd160* (-2,46), *Ccnd2* (-2,34), *Il22* (-2,11) und *Nfatc1* (-1,80). Den höchsten HPCDA-Score in der Analyse ergab sich für *Pel1l* (FC +1,44) mit 971,74; außerdem waren *Rasal* (900,32, FC +1,37), *Tnfrsf14* (837,90, FC -1,74), *Foxp1* (829,60, FC +1,54), *Ipmk* (818,83, FC +1,54), *Klf2* (763,53, FC +2,26), *Ccr7* (746,11, FC +2,14), *Icos* (744,93, FC +1,37), *Sgms1* (661,58, FC +1,80) und *Nfatc1* (605,90, FC -1,37) durch einen hohen HPCDA-Score gekennzeichnet.

In den Tab. 10 bis Tab. 16 sind einige ausgewählte Gene nach funktionellen Gruppen sortiert und deren Expressionsveränderung nach später ICOS-L Blockade dargestellt; außerdem ist vermerkt, ob das Gen signifikant differentiell reguliert wurde. Ein Gen kann dabei mehreren funktionellen Gruppen zugeordnet sein.

Von den Genen mit einer bekannten Funktion für T_{FH}-Zellen wurden einige signifikant reguliert. Gene, die auf T_{FH}-Zellen hoch exprimiert sind oder für die T_{FH}-Zelldifferenzierung wichtig sind, wurden nach Blockade der ICOS-Signale runterreguliert: *Il4* (-1,72), *Il21* (-1,46), *Pdcd1* (-1,37) und *Batf* (-1,23). Gene, die auf T_{FH}-Zellen schwach exprimiert sind oder die T_{FH}-Zelldifferenzierung inhibieren, wurden hingegen hochreguliert: *Ccr7* (+2,14), *Selplg* (+1,62), *Gata3* (+1,37), *Stat5a* (+1,32) und *Stat5b* (+1,32) (Tab. 11). Die einzige Ausnahme stellte *Icos* (+1,37) dar, das auf T_{FH}-Zellen und nicht-T_{FH}-Zellen hoch exprimiert wurde (Abb. 16) und nach Blockade seines Liganden hochreguliert wurde. Die Expressionsveränderung dieser Gene war 6 h nach Blockade der ICOS-Kostimulation allerdings recht gering (maximal 2,14-fach). Unter den nicht signifikant regulierten Genen befanden sich unter anderem *Bcl6*, *Irf4*, *Blr1* (CXCR5) und *Maf*.

Für die positiven Kostimulatoren *Tnfrsf4* (OX40) (-1,28) und *Tnfrsf9* (4-1BB) (-1,68) konnte eine signifikante negative Regulation nach ICOS-L Blockade bzw. für *Slamf1* (*Slam*) keine Regulation nachgewiesen werden. Die negativen Kostimulatoren hingegen wurden entweder hochreguliert (*Ctla4*, +1,52), runterreguliert (*Pdcd1* (PD-1), -1,37) oder nicht signifikant reguliert (*Btla*). *Pdcd1lg2* (PD-L2) (-1,60) sowie die HVEM-Liganden *Tnfsf14* (LIGHT) (-1,74) und *Cd160* (-2,46) wurden signifikant negativ reguliert, während *Tnfsf11* nicht signifikant reguliert wurde (Tab. 11 und Tab. 13).

Eine Hochregulation nach Blockade der ICOS-Signale konnte auch für *Sell* (CD62L) (+1,87) und *Slamf6* (Ly108) (+1,62) nachgewiesen werden (Tab. 11).

Für Gene, die in der Apoptose involviert sind, konnte keine eindeutige Tendenz der Regulation nach Blockade der ICOS-Kostimulation festgestellt werden. Unter den pro-apoptotischen Genen (u.a. *Bcl2l11* (Bim) (+2,04), *Bbc3* (Puma) (+1,49), *Cyts* (cytochrome c) (-1,37), *Tnf* (-1,52) und *Fasf* (-1,57)) sowie den anti-apoptotischen Genen (u.a. *Sgms1* (+1,80), *Rasa1* (+1,37), *Stat5b* (+1,32), *Stat5a* (+1,25) und *Il4* (-1,71)) konnten jeweils positiv und negativ regulierte Gene nachgewiesen werden (Tab. 14). Die potentiellen Überlebensfaktoren *Igf1r* (+2,22), *Serpina3g* (+1,41) und *Il7r* (+2,14) wurden allerdings hochreguliert (Tab. 11, Tab. 13 und Tab. 14).

Zusammenfassend bestätigt die Richtung der signifikanten Regulation von einigen für T_{FH}-Zellen wichtigen oder von T_{FH}-Zellen exprimierten Genen die Hypothese, dass die transgenen T_{FH}-Zellen ohne kontinuierliche ICOS-Kostimulation einen nicht-T_{FH}-Zellphänotyp annehmen.

Tab. 10: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade: Gene mit bekannter Funktion für T_{FH}-Zellen.

Gensymbol	Genname	FC	HPCDA-Score
<i>Ccr7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7	+2,14	746,11
<i>Selplg</i>	P-selectin glycoprotein ligand 1, CD162, PSGL	+1,62	584,38
<i>Icos</i>	inducible T-cell co-stimulator	+1,37 / +1,37 / +1,23	744,93 / 577,58 / 260,91
<i>Gata3</i>	GATA binding protein 3	+1,37	220,07
<i>Stat5b</i>	signal transducer and activator of transcription 5B	+1,32	259,62
<i>Stat5a</i>	signal transducer and activator of transcription 5A	+1,25	198,55
<i>Batf</i>	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	-1,23	228,66
<i>Pdcd1</i>	programmed cell death 1, PD-1	-1,37	217,57
<i>Il21</i>	interleukin-21	-1,46	245,49
<i>Il4</i>	interleukin-4	-1,71	213,87
<i>Irf4</i>	interferon regulatory factor 4	n.s.	–
<i>Cxcr4</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4, CXCR4	n.s.	–
<i>Sh2d1a</i>	SH2 domain protein 1A, SAP	n.s.	–
<i>Btla</i>	B and T lymphocyte associated	n.s.	–
<i>Il27ra</i>	interleukin-27 receptor, alpha	n.s.	–
<i>Bcl6</i>	B cell leukemia/lymphoma 6	n.s.	–
<i>Blr1</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 5, CXCR5	n.s.	–
<i>Il21r</i>	interleukin-21 receptor	n.s.	–
<i>Maf</i>	avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog, c-Maf	n.s.	–

Daten der Microarray-Analyse: Für ausgewählte Gene ist die n-fache Regulation (FC, *fold change*) der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen 6 h nach anti-ICOS-L-Ak-Applikation im Vergleich zur Kontroll-Ak-Applikation an Tag 6 angegeben. Eine positive Regulation bedeutet eine höhere Genexpression nach ICOS-L Blockade. Der HPCDA-Score ist ein Maß für die Relevanz der differentiellen Veränderung. Einige Gene sind mehrfach auf dem Genchip vorhanden; es ist jeweils die Regulation und der zugehörige HPCDA-Score angegeben. Ein Gen kann mehreren funktionellen Gruppen zugeordnet sein. n.s.: nicht signifikante Regulation.

Tab. 11: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade: Gene mit potentieller Funktion für T_{FH}-Zellen.

Gensymbol	Genname	FC	HPCDA-Score
<i>Il7r</i>	interleukin-7 receptor	+2,14	383,31
<i>Sell</i>	L-selectin, CD62L	+1,87 / +1,71	206,75 / 197,83
<i>Slamf6</i>	SLAM family member 6, Ly108	+1,62 / +1,60	504,23 / 175,05
<i>Ctla4</i>	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	+1,52	522,20
<i>Tnfrsf4</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, CD134, OX40, Ly-70	-1,28	188,81
<i>Tnfrsf9</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, CD137, 4-1BB, Ly63	-1,68	187,78
<i>Tnfsf14</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14, HVEM, LIGHT, Ly113	-1,74	837,90
<i>Cd160</i>	CD160 antigen	-2,07 / -2,26 / -2,46	192,79 / 196,32 / 405,99
<i>Il4ra</i>	interleukin-4 receptor, alpha	n.s.	–

Gensymbol	Genname	FC	HPCDA-Score
<i>Cd200</i>	CD200 antigen	n.s.	–
<i>Cd69</i>	CD69 antigen	n.s.	–
<i>Tbx21</i>	T-box 21, T-bet	n.s.	–
<i>Slamf1</i>	signaling lymphocytic activation molecule family member 1, CD150, Slam	n.s.	–
<i>Tnfsf11</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11, Trance, RANKL	n.s.	–

Tab. 12: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade: Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	Genname	FC	HPCDA-Score
<i>Bach2</i>	BTB and CNC homology 2	+2,73 / +2,55	308,79 / 300,55
<i>Klf2</i>	Kruppel-like factor 2 (lung)	+2,26	763,53
<i>Pou2f2</i>	POU domain, class 2, transcription factor 2	+2,18 / +1,90	638,65 / 272,63
<i>Rere</i>	arginine glutamic acid dipeptide (RE) repeats	+2,03	168,02
<i>Klf3</i>	Kruppel-like factor 3 (basic)	+1,90 / +1,41	190,82 / 224,67
<i>Tbx6</i>	T-box 6	+1,77	193,79
<i>Foxp1</i>	forkhead box 1	+1,57 / +1,54 / +1,32	568,43 / 829,60 / 200,56
<i>Rora</i>	RAR-related orphan receptor alpha	+1,49	521,99
<i>Jak3</i>	Janus kinase 3	+1,39	241,33
<i>Gata3</i>	GATA binding protein 3	+1,37	220,07
<i>Rfx1</i>	regulatory factor X, 1	+1,37	306,30
<i>Stat5b</i>	signal transducer and activator of transcription 5B	+1,32	259,62
<i>Irf3</i>	interferon regulatory factor 3	+1,27	191,75
<i>Stat5a</i>	signal transducer and activator of transcription 5A	+1,25	198,55
<i>Batf</i>	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	-1,23	228,66
<i>Xbp1</i>	X-box binding protein 1	-1,30	216,42
<i>Klf10</i>	Kruppel-like factor 10	-1,77	185,13
<i>Smad3</i>	MAD homolog 3 (Drosophila)	-1,34	196,39
<i>Nfatc1</i>	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	-1,34 / -1,37 / -1,80	194,21 / 605,90 / 244,71

Tab. 13: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade: Zelldifferenzierungsmarker.

Gensymbol	Genname	FC	HPCDA-Score
<i>Igf1r</i>	insulin-like growth factor I receptor	+2,22 / +2,0 / +2,0	571,23 / 431,27 / 549,09
<i>Il7r</i>	interleukin-7 receptor	+2,14	383,31
<i>Ccr7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7	+2,14	746,11
<i>Itga4</i>	integrin alpha 4	+2,04	374,76
<i>Sell</i>	L-selectin, CD62L	+1,87 / +1,71	206,75 / 197,83
<i>Lag3</i>	lymphocyte-activation gene 3	+1,77	216,16

Gensymbol	Gename	FC	HPCDA-Score
<i>Il18r1</i>	interleukin-18 receptor 1	+1,74	186,21
<i>Il10ra</i>	interleukin-10 receptor, alpha	+1,68	510,42
<i>Selplg</i>	P-selectin glycoprotein ligand 1, CD162, PSGL	+1,62	584,38
<i>Ctla4</i>	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	+1,52	522,20
<i>Cd97</i>	CD97 antigen	+1,46	225,98
<i>Icos</i>	inducible T-cell co-stimulator	+1,37 / +1,37 / +1,23	744,93 / 577,58 / 260,91
<i>Cd47</i>	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	+1,23	195,15
<i>Tnfrsf4</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, CD134, OX40, Ly-70	-1,28	188,81
<i>Tfrc</i>	transferrin receptor, CD71	-1,34	247,20
<i>Cd22</i>	CD22 antigen	-1,37	210,45
<i>Pdcd1</i>	programmed cell death 1, PD-1	-1,37	217,57
<i>Fasl</i>	Fas ligand, (TNF superfamily, member 6), Tnfsf6, CD95L	-1,57	206,37
<i>Pdcd1lg2</i>	programmed cell death 1 ligand 2, PD-L2	-1,60	181,16
<i>Tnfrsf9</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, CD137, 4-1BB, Ly63	-1,68	187,78
<i>Tnfsf14</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14, HVEM, LIGHT, Ly113	-1,74	837,90
<i>Cd160</i>	CD160 antigen	-2,07 / -2,26 / -2,46	192,79 / 196,32 / 405,99

Tab. 14: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade: Apoptose-zugehörige Gene (pro- und anti-apoptotisch).

Gensymbol	Gename	FC	HPCDA-Score
<i>Pim2</i>	proviral integration site	+2,22	685,69
<i>Bcl2l11</i>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator), Bim	+2,04 / +1,87	445,88 / 506,41
<i>Cited2</i>	Cbp/p300-interacting transactivator	+1,90 / +1,52	562,89 / 574,83
<i>Irak3</i>	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	+1,97	190,09
<i>Akt3</i>	thymoma viral proto-oncogene 3	+1,87	209,92
<i>Sgms1</i>	sphingomyelin synthase 1	+1,80	661,58
<i>Fastk</i>	Fas-activated serine/threonine kinase	+1,77	282,07
<i>Cflar</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	+1,68	191,07
<i>Bbc3</i>	BCL2 binding component 3, Puma	+1,49	201,14
<i>Pik3cd</i>	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide, p110 delta	+1,65 / +1,47	191,07 / 598,91
<i>Sphk2</i>	sphingosine kinase 2	+1,46	204,02
<i>Serpina3g</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	+1,41	213,85
<i>Rasa1</i>	RAS p21 protein activator 1, RasGAP, Gap	+1,37 / +1,37	900,32 / 211,04
<i>Stat5b</i>	signal transducer and activator of transcription 5B	+1,32	259,62
<i>Acin1</i>	apoptotic chromatin condensation inducer 1	+1,30	179,45
<i>Stat5a</i>	signal transducer and activator of transcription 5A	+1,25	198,55

Gensymbol	Gename	FC	HPCDA-Score
<i>Tnfrsf4</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, CD134, OX40, Ly-70	-1,28	188,81
<i>Cycs</i>	cytochrome c, somatic	-1,34 / -1,37	188,68 / 203,23
<i>Kras</i>	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	-1,37	207,06
<i>Il21</i>	interleukin-21	-1,46	245,49
<i>Tnf</i>	tumor necrosis factor, TNFalpha	-1,52	468,71
<i>Pten</i>	phosphatase and tensin homolog	-1,54	171,65
<i>Fasl</i>	Fas ligand, (TNF superfamily, member 6), Tnfsf6, CD95L	-1,57	206,37
<i>Il4</i>	interleukin-4	-1,71	213,87
<i>Klf10</i>	Kruppel-like factor 10	-1,78	185,13

Tab. 15: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade: Gene mit bekannter Funktion für die Signaltransduktion (insbesondere PI3K-Signaltransduktion).

Gensymbol	Gename	FC	HPCDA-Score
<i>Pik3ip1</i>	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	+1,83	388,82
<i>Rasa3</i>	RAS p21 protein activator 3	+1,71	513,71
<i>Pik3cd</i>	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide, p110 delta	+1,65 / +1,47	191,07 / 598,91
<i>Pik3r5</i>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101	+1,62	502,07
<i>Ipmk</i>	inositol polyphosphate multikinase	+1,54	818,83
<i>Pitpnm1</i>	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1	+1,52	597,63
<i>Ihpk1</i>	inositol hexaphosphate kinase 1, Ip6ki, Itpk6	+1,52	496,45
<i>Rasgef1a</i>	RasGEF domain family, member 1A	+1,44	223,30
<i>Rasa1</i>	RAS p21 protein activator 1, RasGAP, Gap	+1,37 / +1,37	900,32 / 211,04
<i>Ikbke</i>	inhibitor of kappaB kinase epsilon	+1,34	206,70
<i>Hsp90aa1</i>	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	-1,41	199,47
<i>Eif4e</i>	eukaryotic translation initiation factor 4E	-1,46	198,56
<i>Pten</i>	phosphatase and tensin homolog	-1,54	171,65

Tab. 16: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade: sonstige Gene.

Gensymbol	Gename	FC	HPCDA-Score
<i>Itga7</i>	integrin alpha-7	+2,98	581,13
<i>Gzma</i>	granzyme A, TSP1	+2,46	387,75
<i>Pelil</i>	pellino-1	+1,44 / +1,32	971,74 / 225,69
<i>Il22</i>	interleukin-22, interleukin-10-related T cell-derived inducible factor	-2,11	188,43
<i>Ccnd2</i>	cyclin D2	-1,83 / -1,87 / -2,0 / -2,14 / -2,22 / -2,34	175,93 / 207,84 / 458,58 / 237,05 / 440,40 / 218,74
<i>Rel</i>	c-Rel, reticuloendotheliosis oncogene	n.s.	–

Gensymbol	Genname	FC	HPCDA-Score
<i>Irf8</i>	interferon regulatory factor 8	n.s.	–

5.5.12 Validierung der Genexpression einiger ausgewählter Gene in transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen über *realtime*-RT-PCR

Für die Validierung der Microarray-Daten mit Hilfe der *realtime*-RT-PCR wurden einige Gene ausgewählt. Zusätzlich zu der RNA der transgenen T_{FH}-Zellen, die im Microarray eingesetzt wurde (siehe 5.5.11), wurde auch die RNA der transgenen nicht-T_{FH}-Zellen analysiert, die ebenfalls 6 h nach anti-ICOS-L- oder Kontroll-Antikörper-Applikation sortiert wurden (siehe 5.5.10). Somit konnte überprüft werden, ob die hier untersuchten Gene selektiv nur in den transgenen T_{FH}-Zellen nach Blockade der ICOS-Kostimulation reguliert wurden. Außerdem konnte die Genexpression in transgenen T_{FH}- versus nicht-T_{FH}-Zellen verglichen werden (nach Gabe des Kontroll-Antikörpers und somit ohne Blockade der ICOS-Signale). Aufgrund des limitierten RNA-Materials konnte hier nur die transgene T_{FH}-Zell-RNA des ersten Experimentes, die für die Microarray-Analyse verwendet wurde, analysiert werden. Für die transgenen nicht-T_{FH}-Zellen stand RNA-Material aus beiden unabhängigen Experimenten zur Verfügung.

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse der *realtime*-RT-PCR die Daten der Microarray-Analyse. Für die untersuchten Gene wurde in den transgenen T_{FH}-Zellen des ersten Experimentes sogar zumeist eine etwas höhere Regulation nachgewiesen als es im Microarray der Fall war (Abb. 31 A & E). Nur für die Gene *Batf*, *Ipmk* und *Nfatc1* wurde in der *realtime*-RT-PCR eine leicht geringere Regulation für das untersuchte Experiment festgestellt. Für *Maf* bzw. *Tnfsf11*, die im Microarray nicht signifikant reguliert wurden, wurde eine vernachlässigbare Expressionsveränderung von -1,09-fach (*Maf*) bzw. -1,78-fach (*Tnfsf11*) nach ICOS-L Blockade bestimmt (Abb. 31 A). *Prdm1* (BLIMP-1), für das im Microarray kein Signal erhalten wurde, wurde nach Blockade der ICOS-Signale hochreguliert (+1,28) (Abb. 31 A).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die hier analysierten Gene durch die späte Blockade der ICOS-Kostimulation selektiv die Expression in den transgenen T_{FH}- und nicht in den nicht-T_{FH}-Zellen beeinflusst wurde. Die Genexpressionsveränderung in den transgenen nicht-T_{FH}-Zellen betrug nach ICOS-L Blockade maximal 1,28-fach (Ausnahme *Ii21* und *Klf2*) und war immer geringer als in den transgenen T_{FH}-Zellen desselben Experimentes (Abb. 31 A & B). Nur *Klf2* wurde in den transgenen nicht-T_{FH}-Zellen etwas stärker reguliert (+1,43), wurde aber in den transgenen T_{FH}-Zellen mit +3,51 weit stärker hochreguliert (Abb. 31 A & B). *Batf*, *Ipmk* und *Maf* wurden in den beiden unabhängigen Experimenten einmal sehr schwach positiv und einmal sehr schwach negativ reguliert, was darauf hindeutet, dass diese Gene zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar durch die ICOS-L Blockade

reguliert wurden (Abb. 31 B). Einzig *Il21* wurde in dem ersten Experiment nach ICOS-L Blockade in den transgenen nicht-T_{FH}-Zellen stärker abgeschwächt exprimiert als in den transgenen T_{FH}-Zellen (-2,19 versus -1,79). Allerdings konnte dieser Effekt in dem zweiten unabhängigen Experiment nicht beobachtet werden (+1,05-fache Regulation in den transgenen nicht-T_{FH}-Zellen) (Abb. 31 A & B).

Gene, die in den transgenen T_{FH}-Zellen eine höhere Expression als in den transgenen nicht-T_{FH}-Zellen aufwiesen (*Batf*, *Il21*, *Nfatc1* und *Tnfrsf11*), wurden nach Unterbrechung der ICOS-Kostimulation generell runterreguliert, bzw. umgekehrt (*Bach2*, *Bcl2l11*, *Foxp1*, *Klf2*, *Pelil* und *Prdm1*) (Abb. 31 A & C). Die transgenen T_{FH}-Zellen veränderten somit ihre Expression in Richtung nicht-T_{FH}-Zellphänotyp, wenn sie keine Signale über ICOS mehr erhielten. Die einzigen Ausnahmen waren die Gene *Ipmk*, *Statb5* und *Maf*. *Ipmk* und *Statb5* wurden nur leicht stärker in den transgenen T_{FH}-Zellen im Vergleich zu den nicht-T_{FH}-Zellen exprimiert (nach Kontroll-Antikörper-Applikation) und wurden bei blockierter ICOS-Kostimulation leicht hochreguliert. *Maf* als Ziel der ICOS-Signaltransduktion (Nurieva et al., 2003a) wurde in den T_{FH}-Zellen stärker als in den nicht-T_{FH}-Zellen exprimiert und wurde interessanterweise 6 h Blockade der ICOS-Signale fast unverändert exprimiert (-1,09).

Die Heatmap in Abb. 31 D verdeutlicht die Expressionsstärken der hier analysierten Gene in den transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen 6 h nach Applikation des anti-ICOS-L- oder Kontroll-Antikörpers. Anhand der Cluster-Analyse erkennt man außerdem das ähnliche Expressionsmuster von *Bach2*, *Bcl2l11*, *Foxp1*, *Klf2*, *Pelil* und *Prdm1*, die in den transgenen T_{FH}-Zellen schwächer exprimiert und nach ICOS-L Blockade hochreguliert wurden und die sich somit in ihrem Expressionsmuster von den anderen Genen deutlich unterschieden. Weiterhin zeigte sich, dass die transgenen nicht-T_{FH}-Zellen für die hier analysierten Gene eine andere Genexpression als die transgenen T_{FH}-Zellen aufwiesen. Zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Blockade der ICOS-Signale (6 h) war die Genexpression in den transgenen T_{FH}-Zellen noch sehr ähnlich zu der in den transgenen T_{FH}-Zellen, die noch Signale über ICOS erhielten. Dennoch veränderte sich für die meisten der hier untersuchten Gene (Ausnahme: *Ipmk*, *Statb5* und *Maf*) die Expression in Richtung nicht-T_{FH}-Zellphänotyp; besonders deutlich ist dies in der Heatmap für *Bach2*, *Bcl2l11* und *Klf2* zu erkennen (Abb. 31 D).

Anhand der hier analysierten Gene konnte eindeutig gezeigt werden, dass die transgenen T_{FH}-Zellen 6 h nach Blockade des ICOS-Signalweges ihre Genexpression zu der in transgenen nicht-T_{FH}-Zellen hin veränderten und somit zu nicht-T_{FH}-Zellen revertierten.

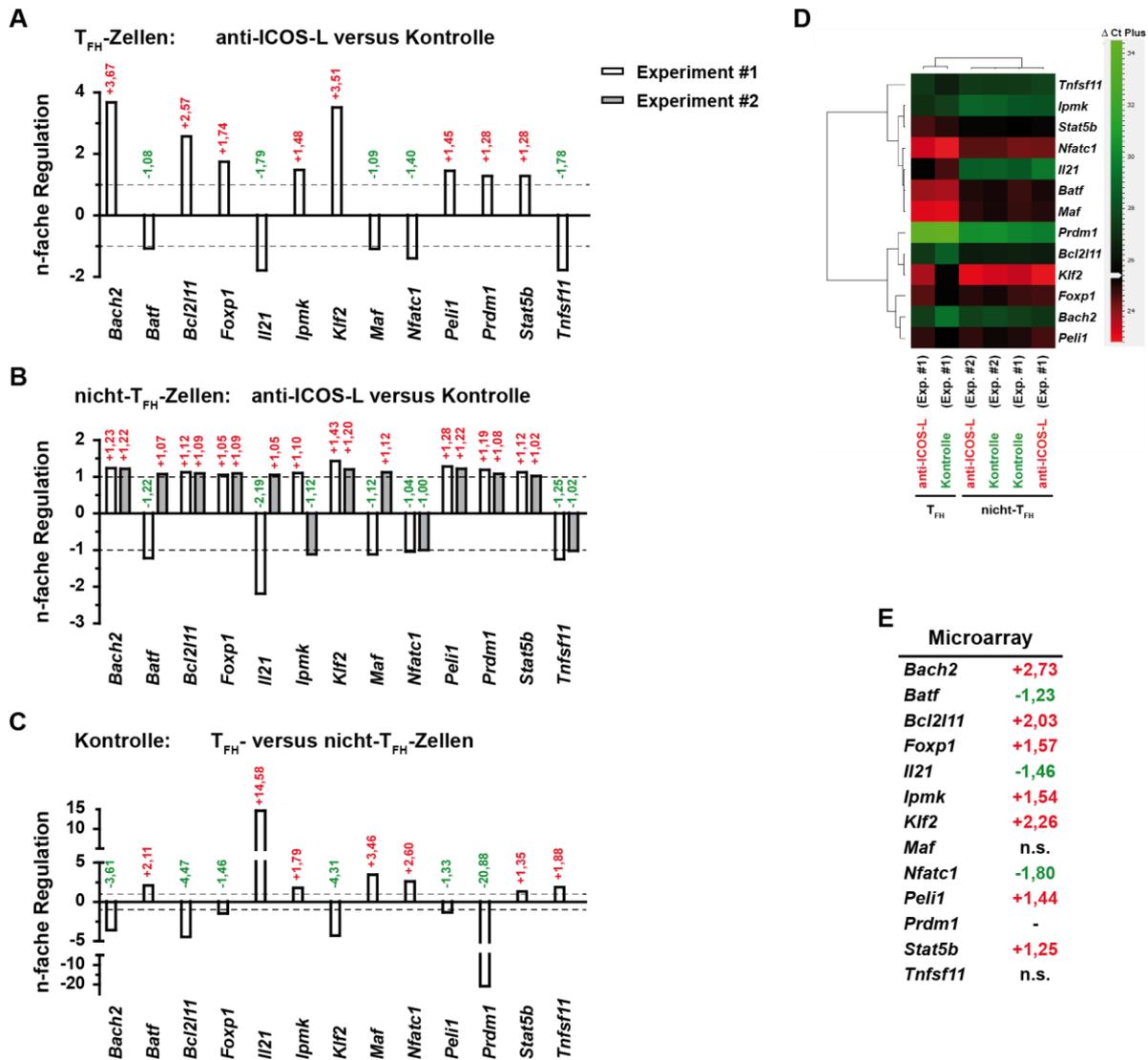


Abb. 31: Regulation der Genexpression in transgenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen nach später ICOS-L Blockade.

Die Genexpression in transgenen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen wurde 6 h nach Kontroll-Ak- oder anti-ICOS-L-Ak-Applikation über *realtime*-RT-PCR bestimmt. Für die Normalisierung wurden die Haushalt-Gene *Hprt1* und *β 2m* verwendet. Es wurde die gleiche RNA der transgenen T_{FH} -Zellen wie für die Microarray-Analyse eingesetzt 5.5.11. Die n-fache Regulation bezieht sich auf die Expressionsveränderung in den transgenen T_{FH} - (A) bzw. nicht- T_{FH} -Zellen (B) nach Blockade der ICOS-Signale im Vergleich zur Kontroll-Ak-Applikation bzw. auf den Expressionsunterschied der transgenen T_{FH} -Zellen im Vergleich mit den transgenen nicht- T_{FH} -Zellen nach Kontroll-Ak-Applikation (C). D) Heatmap und Cluster-Analyse der untersuchten Gene. In rot sind Gene mit einem hohen, in schwarz Gene mit einem mittleren und in grün Gene mit einem niedrigen Expressionsniveau dargestellt, das sich anhand der Ct-Werte der *realtime*-RT-PCR ergibt. Die Ct-Werte sind mit den Haushalt-Genen normalisiert. E) N-fache Regulation der Genexpression der transgenen T_{FH} -Zellen in der Microarray-Analyse aus beiden unabhängigen Experimenten, n.s.: nicht signifikante Regulation, -: kein Signal.

5.5.13 ICOS-Kostimulation spielt in transgenen T-Zellen zu frühen und in transgenen T_{FH}-Zellen zu späten Phasen der Immunreaktion eine unterschiedliche Rolle

Die Funktion von ICOS in der frühen T-Zellaktivierung und in differenzierten T_{FH}- bzw. nicht-T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten wurde hier miteinander verglichen. Dazu wurden für ausgewählte Gene die Daten der Microarray-Analyse (5.3.1 und 5.5.11) und der *realtime*-RT-PCR (5.3.2 und 5.5.12) herangezogen, die aus der Analyse der transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung (ICOS-L KO versus WT) bzw. der transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen an Tag 6 (6 h nach Applikation eines anti-ICOS-L- oder Kontroll-Antikörpers) erhalten wurden.

In den Microarray-Analysen konnten ~470 Gene identifiziert werden, die bei fehlender ICOS-Kostimulation zu frühen Zeitpunkten differentiell reguliert wurden (5.3.1), und ~1.000 Gene, die nach später ICOS-L Blockade in transgenen T_{FH}-Zellen differentiell reguliert wurden (5.5.11). Die Anzahl der regulierten Gene deutet darauf hin, dass ICOS in differenzierten T_{FH}-Zellen an der Regulation von weit mehr Genen beteiligt ist und demnach eine andere und womöglich wichtigere Funktion einnimmt als in der frühen T-Zellaktivierung. Viele der für die *realtime*-RT-PCR-Analyse ausgewählten Gene, die nach der späten Blockade der ICOS-Kostimulation in den transgenen T_{FH}-Zellen in der Microarray-Analyse signifikant differentiell reguliert wurden, wurden zu frühen Zeitpunkten durch fehlende ICOS-Signale in den transgenen T-Zellen in ihrer Expression nicht beeinflusst (*Batf*, *Bcl2l11*, *Foxp1*, *Ipmk*, *Nfatc1*, *Peli1*, *Stat5b* und *Tnfsf11*) (Abb. 32 A & B). Auch *Tnfsf11* wurde lediglich nach später ICOS-L Blockade runterreguliert, der Effekt war in der Microarray-Analyse allerdings nicht signifikant. Einzig *Maf* wurde ausschließlich zu frühen Zeitpunkten signifikant reguliert (Abb. 32 A & B). *Prdm1* wurde zu frühen Zeitpunkten signifikant runterreguliert (Abb. 32 A & Abb. 13 A), in transgenen T_{FH}-Zellen nach ICOS-L Blockade aber leicht hochreguliert (*realtime*-RT-PCR-Daten, Abb. 31 A). *Bach2*, *Il2* sowie *Klf2* hingegen wurden unter beiden experimentellen Bedingungen gleich reguliert, d.h. entweder hoch oder runter (Abb. 32 A & B).

Anhand der Heatmap lässt sich die unterschiedliche Expression der in der *realtime*-RT-PCR analysierten Gene in transgenen T-Zellen zu frühen Zeitpunkten der Immunreaktion (40 h) und in transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten (Tag 6) erkennen (Abb. 32 C). So wird z.B. *Il21* 40 h nach Immunisierung in den transgenen T-Zellen noch recht schwach und bei fehlenden ICOS-Signalen noch schwächer exprimiert, während die Expression in den transgenen T_{FH}-Zellen nach Kontroll-Antikörper-Applikation wesentlich höher ist. Auch der für die T_{FH}-Zelldifferenzierung wichtige Transkriptionsfaktor BATF wird auf mRNA-Ebene kaum zu frühen Zeitpunkten exprimiert, in den transgenen nicht-T_{FH}-Zellen leicht und in den transgenen T_{FH}-Zellen am stärksten exprimiert.

Diese Daten zeigen, dass die ICOS-Kostimulation für aktivierte Antigen-spezifische T-Zellen zu frühen Zeitpunkten der Immunreaktion (40 h) eine andere Funktion einnimmt als in bereits differenzierten Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten (Tag 6).

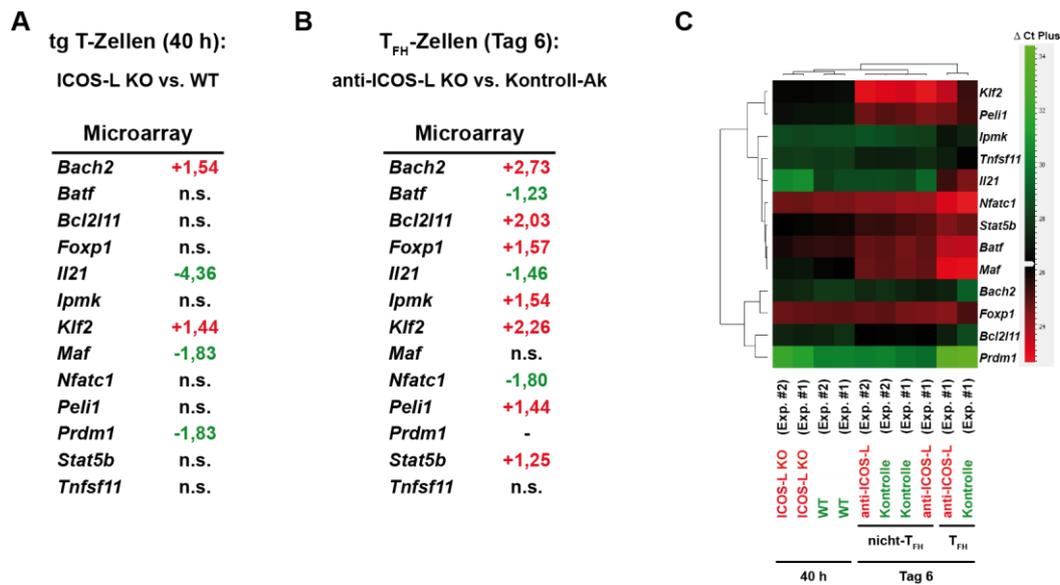


Abb. 32: Regulation der Genexpression bei fehlenden ICOS-Signalen in transgenen T-Zellen zu frühen und in transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten.

Vergleich der Genexpression in transgenen T-Zellen 40 h nach Immunisierung (ICOS-L KO versus WT) und in transgenen T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen an Tag 6 (6 h nach anti-ICOS-L-Ak- oder Kontroll-Ak-Applikation). A) & B) N-Fache Regulation der Genexpression in der Microarray-Analyse für transgene T-Zellen (A) und transgene T_{FH}-Zellen (B). n.s.: nicht signifikante Regulation, -: kein Signal. C) Heatmap und Cluster-Analyse der *realtime*-RT-PCR-Daten für transgene T-, T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen in An- oder Abwesenheit von ICOS-Kostimulation. In rot sind Gene mit einem hohen, in schwarz Gene mit einem mittleren und in grün Gene mit einem niedrigen Expressionsniveau dargestellt, das sich anhand der Ct-Werte der *realtime*-RT-PCR ergibt. Die Ct-Werte sind mit den Haushalt-Genen *Hprt1* und *β2m* normalisiert. Daten aus den Experimenten der Abb. 13 und Abb. 31, siehe 5.3.2 und 5.5.12.

6 Diskussion

6.1 Optimierung des adoptiven T-/B-Kooperationssystems

Um im Rahmen dieser Arbeit Antigen-spezifische T- und B-Zellen *ex vivo* auf Einzelzellebene zu analysieren, wurde ein *in vivo* T-/B-Kooperationssystem verwendet. Die Anzahl von naiven T- bzw. B-Zellen, die für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind, ist in nicht manipulierten Mäusen sehr gering und wird für T-Zellen auf ~150 bis 15.000 Zellen geschätzt (Jenkins et al., 2010). Demzufolge können nur sehr wenige Antigen-spezifische Zellen analysiert werden, die an der Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen teilnehmen. Zudem lassen sich Antigen-spezifische T- bzw. B-Zellen im Laufe einer Immunreaktion schwer verfolgen, da geeignete Marker für deren Nachweis auf Einzelzellebene nicht vorhanden sind bzw. deren Nachweis über ihren für ein bestimmtes Peptid-MHC-Komplex spezifischen TZR bzw. BZR bei geringen Frequenzen problematisch ist. Diese Probleme umgeht der adoptive Zelltransfer, durch den sowohl die Frequenz der analysierbaren Antigen-spezifischen T- bzw. B-Zellen erhöht sowie die transferierten Zellen mit einem kongenen Marker markiert werden können.

In dem hier eingesetzten T-/B-Kooperationssystem wurden OVA-spezifische T-Zellen (OT-II) zusammen mit NP-spezifischen B-Zellen (B1-8i) transferiert (siehe 5.1.1). Ein Nachteil des zu Beginn dieser Arbeit bereits etablierten Systems stellte die hohe Anzahl an transferierten transgenen T- und B-Zellen ($2 \cdot 10^6$ plus $2,5 \cdot 10^6$ Zellen) dar. In diesem System wurden Keimzentren bereits an Tag 3 gebildet, die sich an Tag 6 bis 10 wieder auflösten (Dahler, 2009). Dies war im Vergleich zu WT Mäusen, in denen sich Keimzentren erst an Tag 6 ausbilden, eine unphysiologisch schnelle Immunreaktion. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei den bisher verwendeten transferierten Zellzahlen eine Übersättigung des Systems stattfand. Durch den Transfer von geringeren Zellzahlen (jeweils $0,125 \cdot 10^6$ oder $0,5 \cdot 10^6$ transgene T- und B-Zellen) wurde eine stärkere Proliferation (anhand des CFSE-Profiles und der Zellteilungsgenerationen) und eine höhere relative Expansion sowie eine bessere Aktivierung der transgenen T- und B-Zellen erreicht (Abb. 8). Außerdem konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass bei dem alleinigen Transfer von transgenen B-Zellen ($2 \cdot 10^6$ Zellen) die Expansions- und Aktivierungskinetik recht langsam und physiologisch verläuft und erst durch den Kotransfer von transgenen T-Zellen ($0,5 \cdot 10^6$ oder $2,0 \cdot 10^6$ Zellen) extrem beschleunigt wird. Dies konnte auch für die Bildung von $GL7^+ PNA^+ GC$ B-Zellen in der Durchflusszytometrie gezeigt werden (Abb. 9). Diese Daten sind im Einklang mit einer früheren Studie, in der nachgewiesen wurde, dass eine verringerte Anzahl an adoptiv transferierten OT-II T-Zellen zu höheren Zellteilungszyklen und einem höheren Anteil an differenzierten $IFN-\gamma$ -produzierenden Effektor-T-Zellen führte (Foulds und Shen, 2006). Eine abnormal hohe Frequenz an Antigen-spezifischen T-Zellen wurde für die intraklonale Konkurrenz zwischen den $CD4^+$ T-Zellen mit gleicher Antigen-Spezifität und somit für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht. In

dem System wurde eine bakterielle Infektion mit *Listeria monocytogenes* verwendet, und die Effekte beim Transfer von $0,15 \cdot 10^6$ bis $4,5 \cdot 10^6$ Zellen (Proliferation/CFSE-Profil) bzw. $0,15 \cdot 10^6$ und $1,5 \cdot 10^6$ Zellen (Differenzierung) analysiert. Diese Zellzahlen liegen in einem ähnlichen Bereich, wie sie in dieser Arbeit getestet wurden ($0,125 \cdot 10^6$ bis $2,0 \cdot 10^6$) – mit dem Unterschied, dass hier transgene T- und B-Zellen transferiert wurden. In Übereinstimmung mit den Daten von Foulds und Kollegen (Foulds und Shen, 2006) wurde in dieser Arbeit eine erhöhte Differenzierung der transgenen T-Zellen – hier zu T_{FH} -Zellen – beobachtet, wenn weniger Zellen transferiert wurden (Abb. 11). Für B1-8i B-Zellen wurde eine beeinträchtigte Affinitätsreifung bei hohen Frequenzen an NP-spezifischen B-Zellen und einer somit zu großen intraklonalen Konkurrenz beschrieben (Le et al., 2008). Diese Defizienz konnte aber durch die Immunisierung mit höheren Antigenmengen ausgeglichen werden.

Für das optimierte T-/B-Kooperationssystem wurden aufgrund dieser Erkenntnisse die transferierten Zellzahlen auf $0,25 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und $1 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen festgelegt, die damit weit unter den bisher verwendeten Zellzahlen von $2 \cdot 10^6$ OT-II T-Zellen und $2,5 \cdot 10^6$ B1-8i B-Zellen lagen. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass einerseits möglichst wenig Zellen transferiert werden, um die intraklonale Konkurrenz so gering wie möglich zu halten und eine Übersättigung des Systems zu vermeiden, und dass andererseits ausreichend hohe transgene T- und B-Zellfrequenzen vorliegen, damit insbesondere zu frühen Zeitpunkten der Immunreaktion (vor dem Beginn der Zellexpansion) genügend transgene Zellen zur Analyse zur Verfügung stehen. Durch das T- zu B-Zell-Verhältnis von 1:4 wurde zudem die Kinetik der B-Zellexpansion und -aktivierung wenig beschleunigt. Eine Kinetik mit den neuen Zellzahlen bestätigte, dass das Expansionsmaximum der transgenen T- und B-Zellen erst etwa an Tag 6 erreicht wurde (im bisherigen System war dies etwa an Tag 4) und dass $GL7^+ PNA^+$ GC B-Zellen erst an Tag 8 bis 10 detektierbar (statt etwa an Tag 3) und auch an Tag 14 noch vorhanden waren (Abb. 10). Das neue System entsprach somit den Ansprüchen eines physiologischeren Verlaufes der Immunreaktion.

Für Experimente, in denen Antigen-spezifische T_{FH} -Zellen analysiert wurden, wurde CFA anstelle von Alum-präzipitiertem Protein plus *B. pert.* als Adjuvanz eingesetzt. Daten unserer Arbeitsgruppe wiesen auf eine verstärkte Bildung von T_{FH} -Zellen bei Verwendung von CFA hin (Daten nicht gezeigt), wodurch eine höhere Anzahl an T_{FH} -Zellen optimaler in der Durchflusszytometrie analysiert werden konnte. CFA besteht aus einer Wasser-in-Öl-Emulsion mit abgetöteten *Mycobacterium tuberculosis* Bakterien, das als Adjuvanz eingesetzt eine starke und langanhaltende inflammatorische Reaktion an der Injektionsstelle und im drainierenden Lymphknoten hervorruft. Außerdem wird das Antigen bei Immunisierung mit CFA als Adjuvanz langsam freigesetzt, wodurch es zu einer Depot-Wirkung des Antigens kommt (Billiau und Matthys, 2001). Bei persistierendem Antigen wie in einer chronischen LCMV (Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus)-Infektion werden vorzugsweise T_{FH} -Zellen gebildet, während in einer akuten LCMV-Infektion T_H1 - und T_{FH} -Zellen gebildet werden

(Fahey et al., 2011). Alum-präzipitierte Proteine in Kombination mit *B. pert.* hingegen induzieren eine gemischte Th1- und Th2-Immunantwort (MacLennan et al., 2003). Die hohe inflammatorische Wirkung des Adjuvanzes CFA und der induzierte Antigen-Depot-Effekt scheinen demzufolge für die präferentielle Differenzierung von aktivierten T-Zellen zu T_{FH}-Zellen förderlich zu sein.

In dem T-/B-Kooperationssystem können die Auswirkungen einer fehlenden ICOS-ICOS-L-Interaktion durch zwei verschiedene Situationen analysiert werden. Da ICOS und ICOS-L jeweils keinen weiteren Liganden bzw. Rezeptor besitzen (Mak et al., 2003; Nurieva et al., 2003b; Wong et al., 2003), kann entweder eine ICOS KO oder ICOS-L KO Situation verwendet werden, die beide die gleichen Effekte hervorrufen. Dazu werden entweder Antigen-spezifische ICOS KO T-Zellen in WT Rezipienten oder Antigen-spezifische ICOS-L KO B-Zellen in ICOS-L KO Rezipienten transferiert (Abb. 7). Alternativ kann die ICOS-ICOS-L-Interaktion auch spezifisch zu späten Zeitpunkten unterbrochen werden, indem ein blockierender anti-ICOS-L-Antikörper appliziert wird (Abb. 21).

6.2 ICOS-Signale haben keinen entscheidenden Einfluss auf die frühe T_{FH}-Zelldifferenzierung

Die wichtige Rolle von ICOS für T_{FH}-Zellen war zu Beginn dieser Arbeit schon bekannt, da sowohl ICOS KO als auch ICOS-L KO Mäuse nach Immunisierung eine verringerte Anzahl an T_{FH}-Zellen aufweisen (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006; Nurieva et al., 2008). Die zugrunde liegenden Mechanismen waren jedoch nicht näher untersucht; so z.B. die Frage, ob ICOS für die initiale Differenzierung zu T_{FH}-Zellen oder für deren Aufrechterhaltung notwendig ist. Für die Differenzierung zu T_{FH}-Zellen wurde zuletzt ein Zwei-Phasen-Modell vorgeschlagen (Crotty, 2011). In der initialen Phase induziert der frühe T-Zell/DZ-Kontakt (Tag 2 bis 4) die Expression des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 und stößt somit die T_{FH}-Zelldifferenzierung an. Diese kann in der zweiten Phase aber nur durch den Kontakt mit Antigen-spezifischen B-Zellen aufrechterhalten und abgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass ICOS nicht an der frühen T_{FH}-Zelldifferenzierung beteiligt ist. Auch bei fehlender ICOS-Kostimulation waren T-Zellen in der Lage, BCL-6 im gleichen Maße wie WT T-Zellen hochzuregulieren (Tag 3, Abb. 14 A). Diese Daten stehen im Gegensatz zu einer kürzlich erschienenen Studie von Choi und Kollegen, die eine geringere BCL-6-Induktion in Smarta-TZR transgenen ICOS KO als WT T-Zellen nach adoptiven Transfer und LCMV-Infektion postulieren (Choi et al., 2011). Allerdings hatte sich in der Studie an den analysierten Tagen (Tag 3 und 4) bereits eine klare CXCR5^{high} PD-1^{high} T_{FH}-Zellpopulation ausgebildet. Zudem ist die Auswertung der BCL-6-Expression etwas fragwürdig, da die Expressionsstärke von BCL-6⁺ WT T_{FH}-Zellen (ohne BCL-6⁻ nicht-T_{FH}-Zellen) mit der von allen ICOS KO T-Zellen (BCL-6⁺ T_{FH}- und BCL-6⁻ nicht-T_{FH}-Zellen) verglichen wurde. In der vorliegenden

Arbeit hingegen wurde vor der Ausbildung von T_{FH}-Zellen, die erst an Tag 5 bis 6 stattfand, entsprechend die wirklich frühe T_{FH}-Zelldifferenzierung der T-Zellen analysiert und die BCL-6-Expression der gesamten T-Zellpopulation in WT und ICOS-L KO Situation gegenübergestellt. Dass ICOS, wie in dieser Arbeit festgestellt, nicht die Expression von BCL-6 reguliert, wird durch die Tatsache unterstützt, dass die ICOS-Signaltransduktion über die PI3K verläuft (Rudd und Schneider, 2003) und die PI3K-Untereinheit p110 δ für die Expression von BCL-6 nicht notwendig ist (Rolf et al., 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass andersherum eine Überexpression von BCL-6 zu einer erhöhten ICOS-Expression führt (Johnston et al., 2009). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass BCL-6 kein Ziel der ICOS-Signaltransduktion ist und ICOS nicht an der frühen BCL-6-Induktion und T_{FH}-Zelldifferenzierung beteiligt ist.

Die Menge von BCL-6 allein ist aber nicht entscheidend, ob BCL-6 seine Zielgene induzieren und vor allem seinen Antagonisten BLIMP-1, der die T_{FH}-Zelldifferenzierung inhibiert (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009), supprimieren kann. BCL-6 bildet mit dem Transkriptionsfaktor T-bet einen Komplex, wodurch die DNA-Bindungsdomäne von BCL-6 maskiert wird. Erst bei hohen BCL-6-Konzentrationen und somit einem erhöhten BCL-6/T-bet-Verhältnis kann überschüssiges BCL-6-Protein funktionell werden und die T_{FH}-Zelldifferenzierung induzieren (Oestreich et al., 2012). Eine funktionelle Beeinträchtigung von BCL-6 durch eine möglicherweise erhöhte T-bet-Expression in der Abwesenheit von ICOS kann ausgeschlossen werden, da *Tbx21* (T-bet) auf mRNA-Ebene 40 h nach Immunisierung sogar eine reduzierte Expression aufwies (Microarray-Daten, Tab. 6).

Um einen genaueren Überblick über die Gene zu bekommen, die durch ICOS während der frühen T-Zellaktivierung reguliert werden, wurden Transkriptom-Analysen (Affymetrix-Microarrays) von Antigen-spezifischen T-Zellen 40 h nach Immunisierung in An- oder Abwesenheit von ICOS-Kostimulation durchgeführt (5.3.1). Das Expressionsmaximum von ICOS liegt etwa bei 48 h nach Immunisierung (Burmeister et al., 2008). Der Analysezeitpunkt wurde sehr früh gewählt, um möglichst direkte Ziele der ICOS-Signaltransduktion zu ermitteln. Dabei fiel auf, dass die Expression von nur sehr wenigen Genen (~470) durch eine fehlende ICOS-Kostimulation verändert wurde und auch nur recht geringe Expressionsveränderungen auftraten (+3,0- bis -4,4-fach). Dies zeigt nicht nur, dass die frühe T-Zellaktivierung durch fehlende ICOS-Signale nicht beeinträchtigt wird. Vor allem wiesen nur wenige Gene, die bisher in der Literatur mit einer Funktion für die T_{FH}-Zelldifferenzierung in Verbindung gebracht wurden, eine signifikante Regulation bei fehlender ICOS-Signaltransduktion auf (Tab. 6). Eine eindeutige selektive Hoch- bzw. Runterregulation dieser Gene, die eine eingeschränkte T_{FH}-Zelldifferenzierung nahelegen würde, konnte nicht beobachtet werden. Zum einen ist die Runterregulation vom BLIMP-1, welches *Bcl6* und folglich die T_{FH}-Zelldifferenzierung supprimiert, während der Differenzierung entscheidend (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). *Prdm1* (BLIMP-1) wurde bei fehlenden ICOS-Signalen aber schwächer exprimiert und kann folglich nicht die T_{FH}-Zelldifferenzierung hemmen. Zum anderen wurde IRF4, ein für die

T_{FH}-Zellgenerierung notwendiger Transkriptionsfaktor (Bollig et al., 2012; Kwon et al., 2009), auf mRNA-Ebene bei fehlenden ICOS-Signalen sogar verstärkt exprimiert. Der Transkriptionsfaktor BATF, der direkt die Expression von *Bcl6* und *Maf* reguliert und ebenfalls für die T_{FH}-Zellgenerierung unentbehrlich ist (Betz et al., 2010; Ise et al., 2011), wurde auf mRNA-Ebene hingegen nicht signifikant reguliert. In *Batf*-defizienten T-Zellen konnte nur eine Überexpression von *Bcl6* und *Maf* – nicht die von *Bcl6* allein – die T_{FH}-Zellbildung und -aktivität teilweise wiederherstellen (Ise et al., 2011). In *c-Maf*-defizienten Mäusen wurde nach Immunisierung eine verminderte T_{FH}-Zellgenerierung beobachtet (Bauquet et al., 2009). Diese Studien unterstreichen die Bedeutung von BATF und *c-Maf* neben BCL-6 für die T_{FH}-Zellgenerierung. In der Tat konnte in der hier durchgeführten Microarray-Analyse eine verminderte Expression von *Maf* bei fehlenden ICOS-Signalen festgestellt werden, und *Maf* ist ein bekanntes Ziel der ICOS-Signaltransduktion (Nurieva et al., 2003a). Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass allein eine verminderte Expression von *Maf* die Differenzierung zu T_{FH}-Zellen beeinträchtigt. Das komplexe Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren, die für die T_{FH}-Zelldifferenzierung unentbehrlich sind bzw. deren Abwesenheit notwendig ist, muss in diesem Prozess beachtet werden. So ist es denkbar, dass eine reduzierte *Maf*-Expression durch eine verstärkte Expression von *Irf4* bei gleichzeitiger verminderter Expression von *Prdm1* wieder ausgeglichen wird und die T_{FH}-Zelldifferenzierung dadurch nicht behindert wird. Außerdem ist es möglich, dass in der Studie von Ise und Kollegen durch die *Batf*-Defizienz noch weitere Zielgene von BATF die T_{FH}-Zellgenerierung mit beeinflussen. Bedeutend ist in diesem Zusammenhang die normale Expression des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 auf Proteinebene trotz fehlender ICOS-Kostimulation (Tag 3, Abb. 14 A).

Il21 wurde in der Transkriptom-Analyse als zweitstärkstes reguliertes Gen in Antigen-spezifischen T-Zellen ohne ICOS-Kostimulation identifiziert. ICOS reguliert über *c-Maf* die IL-21-Produktion (Bauquet et al., 2009). Dieser Befund unterstützt die Daten dieser Arbeit, in denen eine fehlende ICOS-Signaltransduktion zu reduzierten mRNA-Spiegeln von *Maf* und *Il21* führte. Oft wurde IL-21 mit einer Funktion für die T_{FH}-Zellbildung in Zusammenhang gebracht und könnte somit einen Mechanismus darstellen, der die Differenzierung von T_{FH}-Zellen bei fehlenden ICOS-Signalen beeinträchtigen würde. Widersprüchliche Studien existieren jedoch über den direkten Effekt von IL-21 auf die T_{FH}-Zellen während ihrer Differenzierung (Crotty, 2011; Ma et al., 2012). Während in einigen Studien die Bildung von T_{FH}-Zellen in einem autokrinen Mechanismus über IL-21R von IL-21 oder von IL-6 abhängig war (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008), zeigte eine andere Studie, dass nur die kombinierte Abwesenheit von IL-21 und IL-6 und nicht das Fehlen eines einzelnen Zytokins die T_{FH}-Zelldifferenzierung unterband (Eto et al., 2011). Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass IL-21 B-Zell-intrinsisch direkt auf B-Zellen wirkte, um unter anderem die Keimzentrums-Bildung und Affinitätsreifung zu kontrollieren (Eto et al., 2011; Linterman et al., 2010; Poholek et al., 2010; Zotos et al., 2010). Für diese widersprüchlichen Daten gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. So könnte IL-21 auch indirekt über die Abhängigkeit der B-Zellen von IL-21 und die Abhängigkeit der

T_{FH}-Zellen von B-Zellen seinen Effekt auf die T_{FH}-Zellen ausüben (Crotty, 2011). IL-21 und IL-6 könnten redundante Funktionen übernehmen (Crotty, 2011; Ma et al., 2012) oder ihre Notwendigkeit für die T_{FH}-Zelldifferenzierung von der Immunisierungsart und -route abhängen (Poholek et al., 2010). Demnach wäre es denkbar, dass Immunisierungsart und -route unterschiedliche Zytokinmilieus hervorrufen und je nach vorliegendem Zytokinmilieu (hohe oder niedrige IL-21- oder IL-6-Konzentrationen) die T_{FH}-Zelldifferenzierung bei fehlendem IL-21 oder IL-6 unterschiedlich beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang ist es einerseits notwendig, die differentielle IL-21-Produktion bei fehlender ICOS-Kostimulation auf Proteinebene zu verifizieren und andererseits zu überprüfen, ob in dem in dieser Arbeit verwendeten adoptiven Transfersystem die T_{FH}-Zelldifferenzierung von IL-21 abhängig ist. Die defekte Generierung von T_{FH}-Zellen zu späteren Zeitpunkten in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation ist ein T-Zell-intrinsischer Effekt (siehe 5.4.3 und 6.4). Demnach kann IL-21 in dem vorhandenen System keinen Einfluss auf die T_{FH}-Zelldifferenzierung haben und die hier zu frühen Zeitpunkten beobachtete verminderte IL-21-Expression in Abwesenheit von ICOS-Signalen auch keine beeinträchtigte T_{FH}-Zelldifferenzierung induzieren.

Die initiale T_{FH}-Zelldifferenzierung ist offensichtlich durch fehlende ICOS-Signale nicht beeinträchtigt, da BCL-6 an Tag 3 unvermindert exprimiert wird. Zwar werden an Tag 3 CXCR5 und PD-1, die häufig als Marker für T_{FH}-Zellen eingesetzt werden, in Abwesenheit von ICOS etwas schwächer hochreguliert als in Anwesenheit von ICOS (Abb. 14 B & C). Allerdings ist der prozentuale Anteil an Antigen-spezifischen CXCR5⁺ PD-1⁺ T-Zellen zu diesem Zeitpunkt unverändert (Daten nicht gezeigt). Ein CXCR5^{high} PD-1^{high} GL7^{high}-Phänotyp wird in den meisten T-Zellen nach Antigen-Kontakt auch noch vor dem Eintritt in den B-Zellfollikel induziert (Kerfoot et al., 2011). Nach der BCL-6-Induktion während des T-Zell/DZ-Kontaktes ist für den Abschluss der T_{FH}-Zelldifferenzierung der Kontakt mit Antigen-spezifischen B-Zellen notwendig (Crotty, 2011; Ma et al., 2012). In Abwesenheit von B-Zellen bzw. Antigen-spezifischen B-Zellen findet keine Bildung von T_{FH}-Zellen statt (Akiba et al., 2005; Haynes et al., 2007; Johnston et al., 2009). Der erste Kontakt zwischen Antigen-spezifischen T- und B-Zellen findet hauptsächlich in der interfollikulären Zone noch vor der Migration in die B-Zellfollikel statt (Kerfoot et al., 2011). Durch den Kontakt wird BCL-6 in den aktivierten pre-T_{FH}-Zellen weiter hochreguliert (Kitano et al., 2011) und die Expression der T_{FH}-Zellmarker PD-1 und ICOS aufrechterhalten (Kerfoot et al., 2011). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch bei fehlender ICOS-Kostimulation die Antigen-spezifischen T-Zellen zur T-/B-Zellgrenze und sogar in die B-Zellfollikel wandern konnten (Tag 4, Abb. 15). Die leicht reduzierte Expression von CXCR5 und die verminderte Runterregulation von *Ccr7* auf mRNA-Ebene beeinträchtigten nicht die Migration. Somit sind die T-Zellen in der Lage, von den B-Zellen die nötigen Signale für die weitere Differenzierung zu T_{FH}-Zellen zu erhalten.

Die wichtigsten Kriterien zur Beurteilung, ob eine initiale T_{FH} -Zelldifferenzierung induziert wird, sind die frühe Expression von BCL-6 und die Wanderung der aktivierten T-Zellen in die B-Zellzone. Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass beide Voraussetzungen auch bei fehlender ICOS-Kostimulation erfüllt werden. ICOS ist demnach nicht an der frühen T_{FH} -Zelldifferenzierung beteiligt.

6.3 ICOS-Kostimulation ist für die Existenz von T_{FH} -Zellen, GC T_{FH} -Zellen und GC B-Zellen notwendig

Wie bereits erwähnt, konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Existenz von T_{FH} -Zellen (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006) und die Ausbildung von Keimzentren (Dong et al., 2001a; Dong et al., 2001b; Mak et al., 2003; McAdam et al., 2001; Nurieva et al., 2003b; Tafuri et al., 2001; Wong et al., 2003) zu späten Zeitpunkten der Immunreaktion entscheidend von ICOS abhängen. Der Beitrag von ICOS auf die Existenz der GC T_{FH} -Zellen, die einen weiter polarisierten Subtyp der T_{FH} -Zellen darstellen und eine erhöhte Fähigkeit zur B-Zellhilfe besitzen sowie IL-21 und IL-4 produzieren (Yusuf et al., 2010), wurde bislang nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ICOS nicht nur für die Generierung der T_{FH} -Zellen an sich, sondern auch für den Subtyp der GC T_{FH} -Zellen essentiell ist (Tag 6 bis 14 nach Immunisierung). Dabei führten fehlende ICOS-Signale aber nicht zu einem selektiven Verlust der GC T_{FH} -Zellen, wie es in SAP-defizienten Mäusen beschrieben wurde (Yusuf et al., 2010), sondern zu einer Reduzierung der GC T_{FH} -Zellfrequenz auf etwa die Hälfte innerhalb der T_{FH} -Zellpopulation, wobei die GL7 T_{FH} -Zellen auch sehr stark vermindert waren (Abb. 17 C). Im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit ist eine Studie erschienen, die ebenfalls den Effekt einer fehlenden ICOS-Kostimulation auf die Differenzierung der GC T_{FH} -Zellen untersuchte und ebenso eine beeinträchtigte Generierung der GC T_{FH} -Zellen beschrieb. Allerdings konnten in dieser Studie, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, fast keine GC T_{FH} -Zellen nachgewiesen werden (Choi et al., 2011).

Die Expression des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6 hingegen war auf den wenigen ausgebildeten Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen der ICOS-L KO Gruppe genauso stark wie in der WT Gruppe (Tag 6 bis 14, Abb. 17 D). BCL-6 kann demnach auch ohne ICOS-Kostimulation exprimiert werden, dahingegen wird die Größe der T_{FH} -Zellpopulation und somit die Anzahl der BCL-6-exprimierenden Zellen von ICOS zu späten Zeitpunkten der Immunreaktion beeinflusst. Auch für frühe Zeitpunkte konnte gezeigt werden, dass ICOS für die Induktion der BCL-6-Expression nicht notwendig ist (Abb. 14 A). Obwohl die wenigen Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen, die sich in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation bildeten, den Mastertranskriptionsfaktor BCL-6 unbeeinträchtigt exprimierten und folglich mit allen Eigenschaften einer T_{FH} -Zelle ausgestattet sein sollten, zeigten diese eine Defizienz in dem B-Zellhilfe-leistenden Subtyp der GC T_{FH} -Zellen. Dies deutet darauf hin, dass ICOS unabhängig von BCL-6 die Funktion von T_{FH} -Zellen reguliert. Welche Moleküle und insbesondere wie ICOS die Expression des GL7-Epitops in den T_{FH} -Zellen genau reguliert, bleibt zu klären.

Zumindest zu frühen Zeitpunkten (Tag 3) wird das GL7-Epitop sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von ICOS-Signalen von nahezu allen Antigen-spezifischen T-Zellen gleich stark hochreguliert (Daten nicht gezeigt).

Aus früheren Publikationen war bekannt, dass bei fehlender ICOS-ICOS-L-Interaktion nur sehr kleine Keimzentren ausgebildet werden und wenige Immunglobuline gebildet werden (Dong et al., 2001a; Dong et al., 2001b; McAdam et al., 2000; Tafuri et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verminderten Keimzentren auf zwei unabhängige Effekte zurückgeführt werden können. Zum einen war die Expansion der Antigen-spezifischen B-Zellen verringert (Abb. 10 B), zum anderen war die Differenzierung zu GC B-Zellen vermindert, was sich in einem reduzierten Anteil an Antigen-spezifischen GC B-Zellen innerhalb der Antigen-spezifischen B-Zellen widerspiegelte (Abb. 17 E). Desweiteren konnte hier erstmalig in demselben System nachgewiesen werden, dass bei fehlender ICOS-Kostimulation eine defekte Generierung von Antigen-spezifischen T_{FH} - und funktionalen GC T_{FH} -Zellen mit einem verminderten Anteil an Antigen-spezifischen GC B-Zellen und klassengewechselten B-Zellen korreliert.

6.4 Differenzierung zwischen T-Zell-intrinsischen und T-Zell-extrinsischen Effekten der fehlenden ICOS-Kostimulation

In der vorliegenden Arbeit wurde ein erweitertes T-/B-Kooperationssystem etabliert, in dem Antigen-spezifische WT und ICOS KO T-Zellen gleichzeitig in denselben Rezipienten transferiert wurden (Abb. 18). Dadurch konnte erstmalig klar gezeigt werden, dass der Defekt in der Ausbildung von T_{FH} -Zellen (Tag 8 nach Immunisierung) bei fehlender ICOS-Kostimulation auf T-Zell-intrinsischen Effekten beruht und nicht durch sekundäre Effekte verursacht wird. Bei dem gleichzeitigen Transfer von Antigen-spezifischen WT und ICOS KO T-Zellen liegen die Zellen in der gleichen Umgebung vor, und durch die Anwesenheit von WT T-Zellen können sich GC B-Zellen normal ausbilden. Allerdings konnten weder die ausgebildeten GC B-Zellen, die ihrerseits für die vollständige Differenzierung zu T_{FH} -Zellen unentbehrlich sind (Haynes et al., 2007), noch der Kontakt mit ihnen die fehlende ICOS-Kostimulation in den ICOS KO T-Zellen kompensieren (Abb. 19 A). Insofern steht für die T_{FH} -Zellgenerierung die Notwendigkeit von ICOS-Signalen in einer höheren Hierarchie als das Vorhandensein von Antigen-spezifischen GC B-Zellen. Desweiteren kann ausgeschlossen werden, dass T-Zell-extrinsische – also sekundäre – Effekte wie lösliche Mediatoren (z.B. IL-21) in dem hier verwendeten adoptiven T-/B-Kooperationssystem für den Defekt in der T_{FH} -Zelldifferenzierung bei fehlenden ICOS-Signalen verantwortlich gemacht werden können. Wie in 6.2 diskutiert, wurde *Il21* zu frühen Zeitpunkten (40 h nach Immunisierung) auf mRNA-Ebene in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation vermindert exprimiert, und IL-21 ist entweder für die Differenzierung von T_{FH} -Zellen und/oder GC B-Zellen notwendig. Da die Antigen-spezifischen WT T-Zellen auch in dem erweiterten

T-/B-Kooperationssystem in der Lage sein sollten, IL-21 zu produzieren, müssten die ICOS KO T-Zellen auf dieses Zytokin reagieren können. Eine Ausnahme würde ein lokal sehr begrenzter Wirkungsraum von IL-21 oder eine reduzierte Expression des IL-21R auf den ICOS KO T-Zellen darstellen. Der IL-21R wurde aber zumindest zu frühen Zeitpunkten (40 h nach Immunisierung) auf mRNA-Ebene in Abwesenheit von ICOS-Signalen nicht differentiell reguliert (Tab. 6).

Auf ICOS-defizienten T-Zellen konnte eine deutlich erhöhte Expression von CD25 festgestellt werden (Abb. 20). IL-2, der Ligand von CD25 (IL-2R α -Kette), inhibiert die BCL-6-Expression und folglich auch die T_{FH}-Zelldifferenzierung (Ballesteros-Tato et al., 2012; Oestreich et al., 2012), wobei die IL-2-vermittelte BCL-6-Inhibierung über die Aktivierung von STAT5 verläuft (Johnston et al., 2012; Nurieva et al., 2012). Weiterhin wurde zu frühen Zeitpunkten nach LCMV-Infektion (Tag 2 bis 3) eine frühe Bifurkation der CD25- versus CXCR5-Expression auf T-Zellen beschrieben. CD25^{high} CXCR5^{low} Zellen exprimierten BLIMP-1 und differenzierten zu nicht-T_{FH}-Zellen, während CD25^{int} CXCR5^{high} Zellen BCL-6 exprimierten und zu T_{FH}-Zellen differenzierten (Choi et al., 2011). Der hier beobachtete erhöhte Anteil an CD25⁺ T-Zellen in Abwesenheit der ICOS-Kostimulation korrelierte mit einem reduzierten Anteil an T_{FH}-Zellen bzw. einem erhöhten Anteil an nicht-T_{FH}-Zellen. In den CD25⁺ T-Zellen kann eine IL-2-vermittelte Inhibierung der T_{FH}-Zelldifferenzierung stattfinden. Allerdings ist der Anteil der CD25⁺ T-Zellen weitaus geringer als der Anteil der nicht-T_{FH}-Zellen. Außerdem wird angenommen, dass die Effekte der IL-2-vermittelten Inhibierung nur während der frühen T_{FH}-Zelldifferenzierung eine Rolle spielen. Denkbar ist, dass die T-Zellen CD25 wieder runterregulieren, sobald sie den Differenzierungsweg zu nicht-T_{FH}-Zellen endgültig eingeschlagen haben, und hier nur diese Zellen CD25⁺ sind, die sich noch im Differenzierungsprozess zu nicht-T_{FH}-Zellen befinden. Da das Adjuvanz CFA eine Depot-Wirkung für das Antigen induziert, ist dies durchaus vorstellbar.

6.5 Kontinuierliche Signale über ICOS sind für die Aufrechterhaltung von differenzierten T_{FH}-Zellen notwendig

T_{FH}-Zellen können sich in ICOS KO Mäusen nicht ausbilden (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006). Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auf einer beeinträchtigten Induktion der T_{FH}-Zelldifferenzierung zu frühen Zeitpunkten beruht. Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob die ICOS-Kostimulation für differenzierte T_{FH}-Zellen von zentraler Bedeutung ist und für die Aufrechterhaltung des T_{FH}-Zellphänotyps erforderlich ist. Dazu wurde die ICOS-Signaltransduktion selektiv zu späten Zeitpunkten (hier ab Tag 6), wenn die T_{FH}-Zellen bereits ausdifferenziert waren, unterbrochen, indem ein blockierender anti-ICOS-L-Antikörper appliziert wurde. Dadurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass für die Aufrechterhaltung des T_{FH}-Zellphänotyps kontinuierliche Signale über ICOS unentbehrlich sind. Nach Blockade der ICOS-Kostimulation sank innerhalb von 24 h die Frequenz und absolute Zellzahl der Antigen-spezifischen

T_{FH}-Zellen, so dass nach 48 h fast keine T_{FH}-Zellen mehr phänotypisch nachgewiesen werden konnten – weder über die typischen T_{FH}-Zellmarker CXCR5 und PD-1, noch über deren Transkriptionsfaktor BCL-6 oder über TIGIT oder CCR7 (Abb. 22 und Abb. 25 und Daten nicht gezeigt). Die Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen gingen aber keineswegs komplett verloren. Es konnte keine erhöhte Apoptose in den T_{FH}-Zellen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe festgestellt werden (Abb. 24). Stattdessen revertierten die T_{FH}-Zellen ihren Phänotyp zu nicht-T_{FH}-Zellen. Ein Beleg dafür ist die konstant bleibende Zellzahl der gesamten Antigen-spezifischen T-Zellpopulation mit einer einhergehenden erhöhten Anzahl an Antigen-spezifischen nicht-T_{FH}-Zellen innerhalb dieser Population (Abb. 23). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die wenigen noch verbliebenen T_{FH}-Zellen zwei Tage nach Beginn der ICOS-L Blockade die Expression T_{FH}-Zell-spezifischer Marker in Richtung nicht-T_{FH}-Zellphänotyp veränderten. Die Expressionsstärke von CXCR5, PD-1 und BCL-6 sowie die IL-21-Produktion waren erniedrigt, wohingegen die Expressionsstärke von CCR7 erhöht war (Abb. 25 und Abb. 28). Eine Transkriptom-Analyse (Microarray und *realtime*-RT-PCR) der Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen 6 h nach Blockade der ICOS-Signale zeigte außerdem, dass für die T_{FH}-Zelldifferenzierung wichtige oder von T_{FH}-Zellen stark exprimierte Gene runterreguliert wurden (z.B. *Batf*, *Il21*, *Il4*, *Pdcd1* (PD-1), *Nfatc1*, *Tnfrsf11*), während negative Regulatoren der T_{FH}-Zellen oder von T_{FH}-Zellen schwach exprimierte Gene hochreguliert wurden (z.B. *Prdm1* (BLIMP-1), *Ccr7*, *Selplg* (PSGL-1), *Stat5a*, *Stat5b*, *Bach2*, *Klf2*, *Foxp1*, *Peli1*) (siehe 5.5.11, 5.5.12 und Abb. 31). Hervorzuheben ist dabei die Hochregulation von *Prdm1* (BLIMP-1), dem Repressor von BCL-6 und der T_{FH}-Zelldifferenzierung. Einige Gene mit bekannter Funktion für T_{FH}-Zellen wurden nicht signifikant reguliert, darunter *Bcl6*, *Maf*, *Sh2d1a* (SAP) und *Irf4* (Tab. 10). Der Grund dafür ist vermutlich der sehr frühe Zeitpunkt nach ICOS-L Blockade für die Transkriptom-Analyse, der möglichst direkte Ziele der ICOS-Signaltransduktion identifizieren sollte. So ist es erklärbar, dass *Batf* nach 6 h bereits auf mRNA-Ebene runterreguliert wurde, seine beiden Zielgene *Bcl6* und *Maf* (Ise et al., 2011) allerdings noch nicht.

Der Befund dieser Arbeit, dass die T_{FH}-Zellen nach Unterbrechung der ICOS-Signale zu nicht-T_{FH}-Zellen revertierten, zeigt außerdem auf, dass der T_{FH}-Zellphänotyp *in vivo* nicht stabil ist und T_{FH}-Zellen keineswegs terminal enddifferenziert sind. Eine Plastizität zwischen den verschiedenen Effektor-T-Zellsubtypen wurde in den letzten Jahren beschrieben, so dass das frühere Konzept einer bestimmten „Linie“ (*lineage*) in Frage gestellt wird. Ein entsprechendes Zytokinprofil ist nicht strikt an eine „Linie“ gebunden, und T-Helferzellsubtypen können auch mehr als einen der klassischen Mastertranskriptionsfaktoren exprimieren (O'Shea und Paul, 2010). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass T_{FH}-Zellen aus T_{H1}- oder T_{H2}-Vorläuferzellen (Fahey et al., 2011; King und Mohrs, 2009; Reinhardt et al., 2009; Zaretsky et al., 2009) und in Peyer'schen Platten aus T_{reg}-Zellen (Tsuji et al., 2009) entstehen können. Bekannt ist auch, dass T_{H1}- und T_{FH}-Zellen eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen (Nakayamada et al., 2011). Ob T_{FH}-Zellen umgekehrt in einen anderen Effektor-T-Zellsubtyp konvertieren können, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Lediglich

für Gedächtnis- T_{FH} -Zellen wurde beschrieben, dass sie in einer sekundären Immunantwort in konventionelle T-Helferzellen oder T_{FH} -Zellen differenzieren konnten (Lüthje et al., 2012; Weber et al., 2012). Im Gegensatz dazu schlussfolgerten Liu und Kollegen, dass T_{FH} -Zellen und nicht- T_{FH} -Zellen *in vivo* stabil sind, da > 80 % dieser Gedächtnis-T-Zellen in einer Sekundärantwort ihren Phänotyp beibehielten (Liu et al., 2012). Die Daten der ersten beiden Studien unterstützen die hier gezeigten Daten, dass T_{FH} -Zellen nicht terminal enddifferenziert sind. In diesem Zusammenhang ist es interessant, die Expression der Mastertranskriptionsfaktoren der anderen Effektor-T-Zellsubtypen (T-bet, GATA-3, ROR γ t und Foxp3) nach Blockade der ICOS-Kostimulation in den T_{FH} -Zellen zu analysieren. Zumindest *Gata3* wurde auf mRNA-Ebene 6 h nach ICOS-L Blockade leicht hochreguliert (Tab. 10).

Offen ist auch noch, ob die T_{FH} -Zellen nach dem Verlust ihres T_{FH} -Zellphänotyps durch die ICOS-L Blockade auch aus dem Keimzentrum und dem B-Zellfollikel auswandern und wie die nicht- T_{FH} -Zellen in der T-Zellzone lokalisiert sind. Die Runterregulation von CXCR5 sowie die Hochregulation von CCR7 und PSGL-1 (nur auf mRNA-Ebene gezeigt), das die CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 binden kann und in der Chemotaxis auf diese Liganden involviert ist (Veerman et al., 2007), legt diese Vermutung nahe.

Obwohl die ICOS-Kostimulation für die Aufrechterhaltung des T_{FH} -Zellphänotyps entscheidend ist, war auch vier bis sechs Tage nach dem Beginn der ICOS-L Blockade noch eine kleine, aber deutlich ausgebildete T_{FH} -Zellpopulation zu erkennen (Abb. 25). Vermutlich sind dies aufgrund der Antigen-Depot-Wirkung von CFA neu gebildete T_{FH} -Zellen. Da die T_{FH} -Zelldifferenzierung nicht von ICOS abhängt, können neue T_{FH} -Zellen entstehen und BCL-6, CXCR5, PD-1 und CCR7 in der gleichen Expressionsstärke wie die T_{FH} -Zellen der Kontroll-Gruppe exprimieren (Abb. 26). Aufgrund der fehlenden ICOS-Signale können diese neu gebildeten T_{FH} -Zellen ihren Phänotyp aber nicht lange aufrechterhalten.

Interessanterweise konnte auf den Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen ab zwei Tage nach Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion eine Hochregulation von ICOS beobachtet werden (Abb. 27). Auch Antigen-spezifische T-Zellen, die adoptiv in ICOS-L KO Tiere transferiert wurden, und T-Zellen in ICOS-L KO Mäusen wiesen eine erhöhte ICOS-Expression auf (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, dass ein negativer Rückkopplungsmechanismus existiert, der nach ICOS-Kostimulation die Expression von ICOS reduziert oder zumindest nicht weiter verstärkt. Dies könnte über weitere Kostimulatoren oder Koinhibitoren, die in einem komplexen System ihre Expression gegenseitig verstärken können und eventuell die ICOS-Expression regulieren, und durch den Kontakt mit APCs der Fall sein. Die Microarray-Daten 6 h nach ICOS-L Blockade zeigten eine leichte Hochregulation von *Gata3*. Da GATA-3 die ICOS-Expression reguliert (Tan et al., 2008), wäre dies ein weiterer möglicher Mechanismus, der zu prüfen wäre. Andererseits kann die erhöhte ICOS-Expression auf den Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen nach später ICOS-L Blockade auch die Revertierung der T_{FH} -Zellen

in nicht- T_{FH} -Zellen widerspiegeln, da auf Antigen-spezifischen nicht- T_{FH} -Zellen eine höhere ICOS-Expression als auf T_{FH} -Zellen nachgewiesen wurde (Abb. 16).

Die Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen verloren nach Blockade der ICOS-Kostimulation nicht nur ihren T_{FH} -Zellphänotyp hinsichtlich der Oberflächenmoleküle und des Mastertranskriptionsfaktors BCL-6, sondern auch in Hinsicht auf ihre Funktion – nämlich die Fähigkeit, IL-21 in hohen Mengen zu produzieren. Auf mRNA-Ebene wurde 6 h nach ICOS-L Blockade eine erniedrigte Expression (Tab. 10 und Abb. 31 A) und auf Protein-Ebene ein reduzierter Anteil an IL-21⁺ T_{FH} -Zellen innerhalb der verbliebenen T_{FH} -Zellpopulation ab zwei Tage nach der ICOS-L Blockade beobachtet (Abb. 28 A). Dabei verloren die Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen nach ihrer Revertierung zu nicht- T_{FH} -Zellen durch Blockade der ICOS-Signale sowie die verbliebenen T_{FH} -Zellen nicht komplett ihre Fähigkeit, IL-21 zu produzieren, sondern passten diese an das Niveau der nicht- T_{FH} -Zellen an (Abb. 28 B). Generell überraschend ist der hohe Anteil an IL-21-Produzenten auch in der nicht- T_{FH} -Zellpopulation. Auf mRNA-Ebene war der Unterschied zwischen Antigen-spezifischen T_{FH} - und nicht- T_{FH} -Zellen hingegen sehr groß (Abb. 31 C). Ein Grund für den hohen Anteil an IL-21⁺ nicht- T_{FH} -Zellen kann die Restimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin zur Analyse darstellen, die nicht die tatsächliche Zytokinproduktion, sondern das Potential einer Zelle zur Zytokinproduktion bestimmt. IL-21 kann neben T_{FH} -Zellen auch von anderen T-Helferzellsubtypen produziert werden, insbesondere für T_H17 -Zellen wurde eine hohe IL-21-Produktion beschrieben (Spolski und Leonard, 2008). Auch die Immunisierungsart mit CFA als Adjuvanz und die damit verbundene hohe Inflammation könnte den hohen Anteil an IL-21-Produzenten innerhalb der Antigen-spezifischen T-Zellen erklären, der nicht innerhalb der endogenen T-Zellpopulation zu sehen war (Abb. 28 C). Nach Immunisierung mit KLH (Keyhole-Limpet-Hämocyanin) konnte in einer IL-21-Reportermaus eine IL-21-Produktion nur in einem Teil der T_{FH} -Zellen, aber nicht in nicht- T_{FH} -Zellen nachgewiesen werden (Lüthje et al., 2012).

Die Revertierung der Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen zu nicht- T_{FH} -Zellen und der damit verbundene Funktionsverlust durch die Reduzierung der IL-21-Produktion innerhalb von zwei Tagen nach ICOS-L Blockade resultierte ab vier Tage nach Unterbrechung der ICOS-ICOS-L-Interaktion in einer verringerten Frequenz und absoluten Zellzahl an Antigen-spezifischen B-Zellen sowie einer leicht erniedrigten Frequenz an GC B-Zellen und klassengewechselten B-Zellen innerhalb der Antigen-spezifischen B-Zellpopulation (Abb. 29 A, B & D). Nur der kombinierte Effekt aus reduzierter Antigen-spezifischer B-Zellzahl und reduzierter Frequenz an GC B-Zellen innerhalb der Antigen-spezifischen B-Zellen bedeutete eine drastische Reduktion in der Anzahl an Antigen-spezifischen GC B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war insofern nicht unerwartet, da die T_{FH} -Zellen für die Ausbildung von Keimzentren wichtig sind, B-Zellhilfe in der Keimzentrums-Reaktion leisten und für die Generierung von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen notwendig sind. Desweiteren liefern

T_{FH} -Zellen den GC B-Zellen wichtige Signale für das Überleben (Crotty, 2011). Insbesondere das von T_{FH} -Zellen sezernierte IL-21 ist sowohl für die Proliferation als auch für die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen essentiell und spielt bei der Regulation der Antikörper-Produktion eine wichtige Rolle (Crotty, 2011; Linterman et al., 2010; Ozaki et al., 2004; Spolski und Leonard, 2008; Zotos et al., 2010). Auch für die BCL-6-Expression in GC B-Zellen ist IL-21 erforderlich (Linterman et al., 2010; Zotos et al., 2010). In dieser Arbeit war die Expressionsstärke von BCL-6 in den nach ICOS-L Blockade verbliebenen GC B-Zellen aber nur leicht reduziert, was eher auf einen quantitativen als qualitativen Effekt hinweist (Tag 12, sechs Tage nach Blockade-Beginn, Abb. 29 C). Möglicherweise konnte die BCL-6-Expression durch das von den nicht- T_{FH} -Zellen produzierte IL-21 aufrechterhalten werden oder die wenigen verbliebenen GC B-Zellen konnten erfolgreich um die Hilfe der wenigen vorhandenen T_{FH} -Zellen konkurrieren. Dies könnte auch eine Erklärung sein, warum der Anteil der GC B-Zellen innerhalb der Antigen-spezifischen B-Zellen nur um etwa ein Viertel gesunken ist (Abb. 29 B). Die späte ICOS-L Blockade führte demnach etwa zwei bis vier Tage nach Verlust der Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen quantitativ zu einer stark verringerten Anzahl an Antigen-spezifischen GC B-Zellen, wobei die restlichen GC B-Zellen offenbar durch ihre aufrechterhaltene BCL-6-Expression noch funktionsfähig waren. Eine Analyse in der Histologie kann Aufschluss darüber liefern, ob die Keimzentren nach Blockade der ICOS-ICOS-L-Interaktion noch strukturell intakt sind oder ob diese sich aufgelöst haben.

Eine ähnliche Studie über den Effekt einer ICOS-L Blockade zu einem späteren Zeitpunkt der Immunreaktion wurde von Choi und Kollegen durchgeführt (Choi et al., 2011). Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit wurde die Blockade der ICOS-Signale aber schon zu einem recht frühen Zeitpunkt (ab Tag 3) nach einer Virusinfektion in einem polyklonalen System durchgeführt. In diesem System hatten sich zum Blockade-Zeitpunkt bereits T_{FH} -Zellen ausgebildet. Ob sich aber GC B-Zellen bereits gebildet hatten, ist in der Studie nicht genannt, aber für den frühen Zeitpunkt nicht zu erwarten. Die ICOS-L Blockade führte innerhalb von fünf Tagen zwar zu reduzierten T_{FH} -Zellfrequenzen, aber keinem kompletten Verlust des T_{FH} -Zellphänotyps wie in der vorliegenden Arbeit. Dahingegen war die Frequenz an GC B-Zellen drastisch reduziert. Allerdings könnte eher die Bildung von Keimzentren per se unterbunden worden sein, da die ICOS-L Blockade sehr früh – womöglich vor deren Differenzierung – stattgefunden hat. Dies ist für ICOS KO Tiere bereits bekannt (Dong et al., 2001a; Dong et al., 2001b; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit hingegen konnten Antigen-spezifische T- und B-Zellen analysiert werden und zum Blockade-Zeitpunkt (Tag 6) hatten sich bereits Antigen-spezifische GC B-Zellen ausgebildet (Daten nicht gezeigt). Deren Frequenz wurde leicht und deren absolute Zellzahl drastisch durch den Verlust der T_{FH} -Zellen reduziert (Abb. 29 B und Daten nicht gezeigt).

6.6 Mögliche Mechanismen der durch ICOS vermittelten Aufrechterhaltung des T_{FH}-Zellphänotyps und Vergleich mit der Rolle von ICOS zu frühen Zeitpunkten

Es konnte gezeigt werden, dass Antigen-spezifische T_{FH}-Zellen ohne anhaltende ICOS-Kostimulation ihren Phänotyp nicht aufrechterhalten konnten und zu nicht-T_{FH}-Zellen revertierten. Um mögliche Mechanismen aufzuklären, die für die ICOS-vermittelte Aufrechterhaltung des T_{FH}-Zellphänotyps verantwortlich sind, wurden umfassende Transkriptom-Analysen der Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen 6 h nach später ICOS-L Blockade (Tag 6) mit Hilfe von Microarrays durchgeführt (siehe 5.5.11). Dadurch konnten ~1.000 Gene identifiziert werden, die im Vergleich zu den Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen der Kontroll-Gruppe signifikant differentiell reguliert wurden. Diese Gene wurden nach verschiedenen funktionellen Gruppen sortiert, und ein Teil dieser Gene ist in den Tab. 10 bis Tab. 16 dargestellt. Einige signifikant regulierte Gene, die anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion als interessante Kandidaten galten, wurden in der *realtime*-RT-PCR validiert und das Expressionsniveau dieser Gene auch mit dem in nicht-T_{FH}-Zellen verglichen (siehe 5.5.12). Zusätzlich wurden auch Antigen-spezifische T-Zellen, die 40 h nach Immunisierung aus WT oder ICOS-L KO Mäusen sortiert wurden (siehe 5.3.1), in der *realtime*-RT-PCR analysiert (siehe 5.3.2). Dadurch sollte ein Vergleich ermöglicht werden, welche dieser getesteten Gene zu frühen Zeitpunkten in aktivierten T-Zellen und/oder zu späten Zeitpunkten in T_{FH}- bzw. nicht-T_{FH}-Zellen von ICOS reguliert werden.

Wie bereits in 6.5 erwähnt, fiel dabei auf, dass generell diejenigen Gene, die in den Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen an Tag 6 schwächer als in den nicht-T_{FH}-Zellen exprimiert wurden, 6 h nach Blockade der ICOS-Signale hochreguliert wurden (*Bach2*, *Bcl2l11*, *Foxp1*, *Klf2*, *Peli1* und *Prdm1*) bzw. umgekehrt (*Batf*, *Il21*, *Nfatc1* und *Tnfrsf11*). Die einzigen Ausnahmen stellten *Ipmk*, *Stat5b* und *Maf* dar (Abb. 31 A & C). Alle in der *realtime*-RT-PCR validierten Gene wurden spezifisch nur in den T_{FH}-Zellen nach später ICOS-L Blockade reguliert, da in den nicht-T_{FH}-Zellen keine Expressionsveränderung dieser Gene beobachtet wurde (Abb. 31 B), obwohl die Antigen-spezifischen nicht-T_{FH}-Zellen sogar eine leicht höhere ICOS-Expression als die T_{FH}-Zellen aufwiesen (Abb. 16). Etwa die Hälfte der in den Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen nach später ICOS-L Blockade regulierten Gene, die in der *realtime*-RT-PCR validiert wurden, zeigten jedoch zu frühen Zeitpunkten (40 h nach Immunisierung) in Antigen-spezifischen T-Zellen bei fehlender ICOS-Kostimulation keine Regulation (Abb. 32). Lediglich *Maf* als bekanntes Ziel der ICOS-Signaltransduktion (Nurieva et al., 2003a) wurde ausschließlich zu frühen Zeitpunkten reguliert.

Die Signaltransduktion über ICOS führt zur Expression des Transkriptionsfaktors NFATc1 und subsequent zur Induktion des Transkriptionsfaktors c-Maf (Nurieva et al., 2007; Nurieva et al., 2003a), und c-Maf wiederum reguliert die Expression von IL-21 in T_{FH}-Zellen (Bauquet et al., 2009). Bei Blockade der ICOS-Kostimulation zu späten Zeitpunkten wurden in den Antigen-spezifischen

T_{FH} -Zellen *Nfatc1* und *Il21* runterreguliert; dieses Ergebnis wird durch die Literatur unterstützt. Nicht signifikant reguliert wurde hingegen *Maf*, dessen Expression direkt von BATF reguliert wird (Ise et al., 2011), welches wiederum auf mRNA-Ebene nur schwach runterreguliert wurde. Möglicherweise wird die *Maf*-Expression erst später als 6 h nach Blockade der ICOS-Signaltransduktion beeinflusst. *Il21* würde demnach noch von anderen Genen als *Maf* reguliert werden. Zu frühen Zeitpunkten (40 h nach Immunisierung) hingegen wurden *Maf* und *Il21* als Effekt der fehlenden ICOS-Kostimulation vermindert exprimiert, allerdings nicht *Nfatc1*. Die ICOS-Signaltransduktion aktiviert die PI3K und nachfolgend Akt/PKB (Rudd und Schneider, 2003). IPMK ist eine PI3K und aktiviert Akt/PKB (Maag et al., 2011). *Ipmk* wird aber nur zu späten Zeitpunkten nach Blockade der ICOS-Kostimulation in den Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen hochreguliert und zu frühen Zeitpunkten nicht reguliert.

Interessanterweise wurde der für die T_{FH} -Zelldifferenzierung notwendige Transkriptionsfaktor BATF (Betz et al., 2010; Ise et al., 2011) in Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen nach Blockade der ICOS-Signale leicht runterreguliert. In Kombination mit der Hochregulation des T_{FH} -Zellsuppressors *Prdm1* (BLIMP-1) impliziert dies, dass die T_{FH} -Zellen bei fehlenden ICOS-Signalen ihren Phänotyp in Richtung nicht- T_{FH} -Zellen veränderten. Diese Hypothese wird auch durch die Hochregulation von *Stat5b* und *Stat5a* bekräftigt (Microarray- und *realtime*-RT-PCR-Daten). Diese Proteine wurden erst vor kurzem als negative Regulatoren der T_{FH} -Zelldifferenzierung beschrieben, die die Expression von *Prdm1* (BLIMP-1) induzieren (Johnston et al., 2012; Nurieva et al., 2012). Zu frühen Zeitpunkten (40 h) hatte die fehlende ICOS-Kostimulation allerdings keine Auswirkung auf die Expression von *Batf* sowie *Stat5a* und *Stat5b*, wohingegen *Prdm1* erhöht war. Dies bestätigt die Annahme, dass ICOS zu frühen Zeitpunkten keinen Einfluss auf die T_{FH} -Zelldifferenzierung besitzt (siehe 6.2).

Pelil wurde als negativer Regulator der T-Zellaktivierung identifiziert und spielt eine wichtige Rolle für den Schutz vor Autoimmunerkrankungen (Chang et al., 2011). Da eine übermäßig hohe Anzahl an T_{FH} -Zellen mit Autoimmunität assoziiert ist (King et al., 2008; Ma et al., 2012), wurde erwartet, dass *Pelil* in Antigen-spezifischen nicht- T_{FH} -Zellen stärker exprimiert wird als in T_{FH} -Zellen und mit einer gedrosselten Ausbildung von T_{FH} -Zellen korreliert. In der Tat wurde *Pelil* in T_{FH} -Zellen schwächer exprimiert und nach später ICOS-L Blockade hochreguliert, die Regulation war allerdings recht gering. Sowohl das pro-apoptotische *Bcl2l1l* (Bim) als auch *Foxp1*, das für den Ruhezustand und die Homöostase von naiven Zellen essentiell ist sowie die Expression des IL-7R reprimiert (Feng et al., 2011), wurden in Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen schwächer exprimiert als in nicht- T_{FH} -Zellen und nach ICOS-L Blockade hochreguliert. Sowohl *Pelil* als auch *Bcl2l1l* und *Foxp1* wurden zu frühen Zeitpunkten (40 h) in Abwesenheit von ICOS-Kostimulation nicht differentiell reguliert.

Für *Bach2* (*BTB and CNC homology 2*) und *Klf2* (*Kruppel-like factor 2*) wurde bereits eine verminderte Expression in T_{FH} -Zellen im Vergleich zu nicht- T_{FH} -Zellen beschrieben (Kitano et al., 2011), was die hier erhaltenen Daten bestätigt (Abb. 31 C). Beide Gene wurden nach später ICOS-L Blockade in den Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen hochreguliert und besaßen von allen signifikant differentiell regulierten Genen in der Microarray-Analyse mit die höchste Expressionsveränderung

(+2,73- bzw. +2,26-fach). Auch zu frühen Zeitpunkten wurden beide Gene bei fehlender ICOS-Kostimulation in Antigen-spezifischen T-Zellen verstärkt exprimiert (Tab. 8). Der Transkriptionsfaktor BACH2 reprimiert die *Prdm1* (BLIMP-1)-Expression in B-Zellen (Martins und Calame, 2008) und wird direkt durch BCL-6 induziert (Alinikula et al., 2011). Demnach wäre eine hohe BACH2-Expression bei geringer BLIMP-1-Expression auch in T_{FH}-Zellen zu erwarten. Aber *Bach2* und *Prdm1* (BLIMP-1) sind hier in den Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen schwächer exprimiert als in den Antigen-spezifischen nicht-T_{FH}-Zellen, und die *Bach2*-Hochregulation korrelierte nicht mit einer verminderten *Prdm1* (BLIMP-1)-Expression in den T_{FH}-Zellen nach später ICOS-L Blockade. Zu frühen Zeitpunkten (40 h) korrelierte jedoch bei fehlender ICOS-Kostimulation eine erhöhte *Bach2*-Expression mit einer erniedrigten *Prdm1* (BLIMP-1)-Expression in Antigen-spezifischen T-Zellen (siehe Tab. 8 und Tab. 6). Dies entspricht der in B-Zellen beschriebenen Funktion von BACH2. Für CD4⁺ T-Zellen aus Nabelschnurblut wurde eine direkte Regulation der IL-2-Expression durch BACH2 beschrieben (Lesniewski et al., 2008). Offensichtlich hat BACH2 in B-Zellen und früh-aktivierten T-Zellen im Vergleich zu differenzierten T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen zu späteren Zeitpunkten eine unterschiedliche Funktion. Oder in differenzierten T_{FH}- und nicht-T_{FH}-Zellen wird die BACH2-induzierte *Prdm1*-Suppression durch andere Proteine unterbunden. IL-21 kann in B-Zellen *in vitro* sowohl die Expression von BLIMP-1 als auch BCL-6 induzieren (Ozaki et al., 2004), die sich gegenseitig supprimieren und die Differenzierung in Plasmazellen bzw. GC B-Zellen induzieren. Dies weist darauf hin, dass immer das komplexe Zusammenspiel mit anderen Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Genexpression mit betrachtet werden muss.

KLF2 reguliert die T-Zellmigration über CD62L, das für den Eintritt in die sekundärlymphatischen Organe wichtig ist, und über S1P1 (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*), das für die Auswanderung aus den sekundärlymphatischen Organen wichtig ist. In naiven T-Zellen induziert KLF2 die Expression von CD62L, CCR7 und S1P1 (Bai et al., 2007; Carlson et al., 2006; Dang et al., 2009; Sebzda et al., 2008) und supprimiert die Expression von CXCR5 (Sebzda et al., 2008) und IL-4 (Weinreich et al., 2009). In aktivierten T-Zellen wird die PI3K aktiviert und Foxo1 anschließend von PKB phosphoryliert, wodurch die Expression von *Klf2* und somit auch von CD62L, CCR7 und S1P1 inhibiert wird (Finlay und Cantrell, 2010; Kerdiles et al., 2009). Folgender Mechanismus ist demnach in differenzierten T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten möglich: Durch die Blockade der ICOS-Signaltransduktion in Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen wird der ICOS-induzierte PI3K-Signalweg unterbrochen und Foxo1 nicht mehr phosphoryliert, wodurch *Klf2* aktiviert werden kann, welches in differenzierten T_{FH}-Zellen schwach exprimiert wird. Durch die KLF2-Induktion könnte dann die Expression von IL-4, die für T_{FH}-Zellen beschrieben wurde (King und Mohrs, 2009; Reinhardt et al., 2009; Yusuf et al., 2010; Zaretsky et al., 2009), und CXCR5 supprimiert sowie die Expression von CD62L, CCR7 und S1P1 aktiviert werden. In der Tat wurde auf mRNA-Ebene 6 h nach ICOS-L Blockade eine erniedrigte Expression von *Il4* und eine erhöhte Expression von *Klf2*, *CD62l* und *Ccr7* in den Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen beobachtet (Tab. 10 bis Tab. 12). Für *Cxcr5* konnte zu dem

frühen Zeitpunkt (6 h nach Blockade der ICOS-Signale) noch keine Regulation auf mRNA-Ebene festgestellt werden, aber auf Protein-Ebene war zwei Tage nach später ICOS-L Blockade eine reduzierte CXCR5-Expression zu sehen (Abb. 26 B). Zu frühen Zeitpunkten (40 h) ist hingegen dieser Mechanismus denkbar: In naiven T-Zellen wird *Klf2* exprimiert und nach Aktivierung runterreguliert. Durch die Hochregulation von ICOS auf aktivierten T-Zellen kann über den PI3K-Signalweg und über die Foxo1-Phosphorylierung *Klf2* inhibiert werden. Bei fehlenden ICOS-Signalen kann die *Klf2*-Expression allerdings nicht so stark supprimiert werden, was in den T-Zellen eine höhere Expression zur Folge hat im Vergleich zu T_{FH}-Zellen, die Signale über ICOS erhalten (Abb. 13 A, Abb. 32 B und Tab. 8). In den T_{FH}-Zellen scheint die *Klf2*-Expression aufgrund der anhaltenden ICOS-Signale auch zu späten Zeitpunkten noch niedrig zu sein, während sie in den nicht-T_{FH}-Zellen wieder erhöht wird (siehe Heatmap, Abb. 32 C). Insofern ist es denkbar, dass ICOS-Signale über den PI3K-Signalweg und über Foxo1 für eine Suppression der *Klf2*-Expression notwendig sind und die Suppression von *Klf2* für die Aufrechterhaltung des T_{FH}-Zellphänotyps erforderlich ist.

Für die hier näher genannten Gene und auch für weitere in den Microarray-Analysen identifizierte Gene ist erkennbar, dass sie einer unterschiedlichen Regulation durch ICOS in Antigen-spezifischen T-Zellen zu frühen Zeitpunkten und in Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten unterliegen. Wurde ein Gen in beiden Situationen durch fehlende ICOS-Signale signifikant reguliert, war die Richtung der Regulation (hoch oder runter) aber identisch. Auch die Anzahl der Gene, die in den Microarray-Analysen als signifikant reguliert identifiziert wurden, unterschied sich sehr stark zu den untersuchten Zeitpunkten (früh: ~470 Gene, spät: ~1.000 Gene). Für beide Zeitpunkte (früh und spät) wurden jedoch in den Microarray-Analysen nur recht geringe Expressionsveränderungen festgestellt (früh: +3,0- bis -4,4-fach, spät: +4,2- bis -2,5-fach). Zusammenfassend scheint ICOS in T_{FH}-Zellen zu späten Zeitpunkten eine andere und womöglich wichtigere Funktion einzunehmen als in aktivierten T-Zellen zu frühen Zeitpunkten.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Regulation der Gene, die auf mRNA-Ebene nach später ICOS-L Blockade in Antigen-spezifischen T_{FH}-Zellen als signifikant reguliert identifiziert wurden, nicht mehr auf Protein-Ebene verifiziert werden. Neben den hier diskutierten Genen bietet sich auch die Analyse weiterer Gene auf Protein-Ebene nach später ICOS-L Blockade an. So kann z.B. die Zytokinproduktion (IL-21, IL-4, IL-10, IL-17, IL-12, IFN- γ) sowie die Expression der Mastertranskriptionsfaktoren der T-Helferzellsubtypen (T-bet, GATA3, Foxp3) in den T_{FH}-Zellen untersucht werden und mit denen in nicht-T_{FH}-Zellen verglichen werden. Weiterhin können Proteine mit in der Literatur beschriebener bekannter oder potentieller Funktion für T_{FH}-Zellen (CXCR5, CCR7, BCL-6, ICOS, IL-21R, CD40L, TIGIT, PSGL-1, Ly108, CD62L), Kostimulatoren (CD69, CD160, LIGHT, OX40, 4-1BB, CTLA-4, RANKL), Transkriptionsfaktoren (KLF2, BACH2) und weitere Proteine (IL-7R, CXCR4, CD25, GL7) untersucht werden. Die vorhandenen Datensätze können auch auf

Proteine aus weiteren hier nicht genannten funktionellen Gruppen weiter ausgewertet werden. Zudem könnte eine Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der späten ICOS-L Blockade einen Überblick über die zeitliche Abfolge der Ereignisse nach Unterbrechung der ICOS-Signaltransduktion geben. Insgesamt bieten diese Daten Ansätze für weitergehende Untersuchungen, um den molekularen Mechanismus der ICOS-vermittelten Aufrechterhaltung des T_{FH} -Zellphänotyps aufzuklären. Insbesondere BACH2 und KLF2 scheinen interessante Kandidaten hierfür zu sein.

6.7 Schlussfolgerung

ICOS ist für die Generierung von T_{FH} -Zellen und GC T_{FH} -Zellen notwendig. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auf einem T-Zell-intrinsischen Effekt beruht. Weiterhin konnte hier nachgewiesen werden, dass die initiale T_{FH} -Zelldifferenzierung unabhängig von ICOS ist. Bei fehlender ICOS-Kostimulation waren Antigen-spezifische T-Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Immunisierung sowohl in der Lage, den Mastertranskriptionsfaktor BCL-6 hochzuregulieren, als auch in die B-Zellfollikel einzuwandern, wo sie weitere für die T_{FH} -Zelldifferenzierung wichtige Signale im Kontakt mit B-Zellen erhalten. Für bereits differenzierte T_{FH} -Zellen waren die Signale über ICOS hingegen unentbehrlich. Ohne eine kontinuierliche ICOS-Kostimulation konnten die T_{FH} -Zellen innerhalb von 48 h phänotypisch nicht mehr detektiert werden, da sie zu nicht- T_{FH} -Zellen revertierten. Umfassende Transkriptom-Analysen 6 h nach Blockade der ICOS-Signale identifizierten eine Vielzahl von Genen, die in den Antigen-spezifischen T_{FH} -Zellen differentiell reguliert wurden. Diese Gene bieten mögliche Ansätze, um die ICOS-vermittelte Aufrechterhaltung des T_{FH} -Zellphänotyps auf molekularer Ebene aufzuklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ICOS nicht für das Überleben, sondern für die Aufrechterhaltung des T_{FH} -Zellphänotyps notwendig ist. T_{FH} -Zellen sind somit nicht terminal enddifferenziert, und ihr Phänotyp ist *in vivo* nicht stabil.

7 Literaturverzeichnis

Aicher, A., Hayden-Ledbetter, M., Brady, W.A., Pezzutto, A., Richter, G., Magaletti, D., Buckwalter, S., Ledbetter, J.A. und Clark, E.A. (2000). Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* *164*, 4689-4696.

Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., *et al.* (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* *127*, 701-721 e701-770.

Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Usui, Y., Harada, N., Yamazaki, T., Ma, J., Tezuka, K., Yagita, H. und Okumura, K. (2005). The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol* *175*, 2340-2348.

Alinikula, J., Nera, K.P., Junttila, S. und Lassila, O. (2011). Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation. *Eur J Immunol* *41*, 2404-2413.

Allen, C.D., Okada, T., Tang, H.L. und Cyster, J.G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* *315*, 528-531.

Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R.R., Selvaggi, T., Kehry, M.R. und Staudt, L.M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* *87*, 5257-5268.

Allman, D.M., Ferguson, S.E. und Cancro, M.P. (1992). Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *J Immunol* *149*, 2533-2540.

Ansel, K.M., McHeyzer-Williams, L.J., Ngo, V.N., McHeyzer-Williams, M.G. und Cyster, J.G. (1999). In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* *190*, 1123-1134.

Arimura, Y., Kato, H., Dianzani, U., Okamoto, T., Kamekura, S., Buonfiglio, D., Miyoshi-Akiyama, T., Uchiyama, T. und Yagi, J. (2002). A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. *Int Immunol* *14*, 555-566.

Bai, A., Hu, H., Yeung, M. und Chen, J. (2007). Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription. *J Immunol* *178*, 7632-7639.

Ballesteros-Tato, A., Leon, B., Graf, B.A., Moquin, A., Adams, P.S., Lund, F.E. und Randall, T.D. (2012). Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* *36*, 847-856.

Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R. und Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* *76*, 34-40.

Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A.A., Wang, K., Lim, W.K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A. und Dalla-Favera, R. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* *115*, 975-984.

Batista, F.D. und Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* *9*, 15-27.

Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.C., Sharpe, A.H. und Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* *10*, 167-175.

- Beier, K.C., Hutloff, A., Dittrich, A.M., Heuck, C., Rauch, A., Buchner, K., Ludewig, B., Ochs, H.D., Mages, H.W. und Kroczeck, R.A. (2000). Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* *30*, 3707-3717.
- Betz, B.C., Jordan-Williams, K.L., Wang, C., Kang, S.G., Liao, J., Logan, M.R., Kim, C.H. und Taparowsky, E.J. (2010). Baf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J Exp Med* *207*, 933-942.
- Billiau, A. und Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* *70*, 849-860.
- Boles, K.S., Vermi, W., Facchetti, F., Fuchs, A., Wilson, T.J., Diacovo, T.G., Cella, M. und Colonna, M. (2009). A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol* *39*, 695-703.
- Bollig, N., Brustle, A., Kellner, K., Ackermann, W., Abass, E., Raifer, H., Camara, B., Brendel, C., Giel, G., Bothur, E., *et al.* (2012). Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 8664-8669.
- Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A.A., *et al.* (2006). ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol* *177*, 4927-4932.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M. und Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* *192*, 1545-1552.
- Brodie, D., Collins, A.V., Iaboni, A., Fennelly, J.A., Sparks, L.M., Xu, X.N., van der Merwe, P.A. und Davis, S.J. (2000). LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr Biol* *10*, 333-336.
- Burmeister, Y. (2009). Die Rolle von ICOS für die T-Zell-Effektorfunktion in vivo. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I (Humboldt-Universität zu Berlin).
- Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A.C., Mages, H.W., Lam, K.P., Coyle, A.J., Kroczeck, R.A. und Hutloff, A. (2008). ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* *180*, 774-782.
- Campbell, D.J., Kim, C.H. und Butcher, E.C. (2001). Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat Immunol* *2*, 876-881.
- Cannons, J.L., Qi, H., Lu, K.T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E.K., Germain, R.N. und Schwartzberg, P.L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* *32*, 253-265.
- Carlson, C.M., Endrizzi, B.T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M.A., Walsh, E.R., Wani, M.A., Lingrel, J.B., Hogquist, K.A. und Jameson, S.C. (2006). Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* *442*, 299-302.
- Cazac, B.B. und Roes, J. (2000). TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* *13*, 443-451.
- Chang, M., Jin, W., Chang, J.H., Xiao, Y., Brittain, G.C., Yu, J., Zhou, X., Wang, Y.H., Cheng, X., Li, P., *et al.* (2011). The ubiquitin ligase Peli1 negatively regulates T cell activation and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* *12*, 1002-1009.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C. und Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* *34*, 932-946.
- Cimmino, L., Martins, G.A., Liao, J., Magnusdottir, E., Grunig, G., Perez, R.K. und Calame, K.L. (2008). Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J Immunol* *181*, 2338-2347.

- Coffman, R.L., Lebman, D.A. und Shrader, B. (1989). Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 170, 1039-1044.
- Coico, R.F., Bhogal, B.S. und Thorbecke, G.J. (1983). Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol* 131, 2254-2257.
- Coyle, A.J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J.A., *et al.* (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, 95-105.
- Crawford, A. und Wherry, E.J. (2009). The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol* 21, 179-186.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29, 621-663.
- Crotty, S., Johnston, R.J. und Schoenberger, S.P. (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* 11, 114-120.
- Dahler, A.C. (2009). Die Rolle von ICOS auf die B-Zelldifferenzierung in einem in vivo Modell. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I (Humboldt-Universität zu Berlin).
- Dang, X., Raffler, N.A. und Ley, K. (2009). Transcriptional regulation of mouse L-selectin. *Biochim Biophys Acta* 1789, 146-152.
- Deenick, E.K. und Ma, C.S. (2011). The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology* 134, 361-367.
- Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D. und Staudt, L.M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.
- Dong, C., Juedes, A.E., Temann, U.A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H. und Flavell, R.A. (2001a). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97-101.
- Dong, C., Temann, U.A. und Flavell, R.A. (2001b). Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol* 166, 3659-3662.
- Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I. und Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One* 6, e17739.
- Fahey, L.M., Wilson, E.B., Elsaesser, H., Fistonich, C.D., McGavern, D.B. und Brooks, D.G. (2011). Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med* 208, 987-999.
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J. und McHeyzer-Williams, M.G. (2009a). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30, 324-335.
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H. und McHeyzer-Williams, M.G. (2009b). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* 10, 375-384.
- Feng, X., Wang, H., Takata, H., Day, T.J., Willen, J. und Hu, H. (2011). Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells. *Nat Immunol* 12, 544-550.
- Finlay, D. und Cantrell, D. (2010). Phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin pathways control T cell migration. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 149-157.
- Fos, C., Salles, A., Lang, V., Carrette, F., Audebert, S., Pastor, S., Ghiotto, M., Olive, D., Bismuth, G. und Nunes, J.A. (2008). ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* 181, 1969-1977.

- Foulds, K.E. und Shen, H. (2006). Clonal competition inhibits the proliferation and differentiation of adoptively transferred TCR transgenic CD4 T cells in response to infection. *J Immunol* 176, 3037-3043.
- Frey, O., Meisel, J., Hutloff, A., Bonhagen, K., Bruns, L., Kroczeck, R.A., Morawietz, L. und Kamradt, T. (2010). Inducible costimulator (ICOS) blockade inhibits accumulation of polyfunctional T helper 1/T helper 17 cells and mitigates autoimmune arthritis. *Ann Rheum Dis* 69, 1495-1501.
- Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirosawa, S., Taniguchi, M., *et al.* (1997). Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* 186, 439-448.
- Gatto, D. und Brink, R. (2010). The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol* 126, 898-907.
- Gigoux, M., Shang, J., Pak, Y., Xu, M., Choe, J., Mak, T.W. und Suh, W.K. (2009). Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20371-20376.
- Glasmacher, E., Hoefig, K.P., Vogel, K.U., Rath, N., Du, L., Wolf, C., Kremmer, E., Wang, X. und Heissmeyer, V. (2010). Roquin binds inducible costimulator mRNA and effectors of mRNA decay to induce microRNA-independent post-transcriptional repression. *Nat Immunol* 11, 725-733.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Drager, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A.A., Mages, H.W., *et al.* (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 4, 261-268.
- Hardtke, S., Ohl, L. und Forster, R. (2005). Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood* 106, 1924-1931.
- Hauser, A.E., Junt, T., Mempel, T.R., Sneddon, M.W., Kleinstein, S.H., Henrickson, S.E., von Andrian, U.H., Shlomchik, M.J. und Haberman, A.M. (2007). Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26, 655-667.
- Haynes, N.M., Allen, C.D., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N. und Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 179, 5099-5108.
- Herman, A.E., Freeman, G.J., Mathis, D. und Benoist, C. (2004). CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 199, 1479-1489.
- Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L. und Keller, J.R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 147, 22-28.
- Ho, I.C., Hodge, M.R., Rooney, J.W. und Glimcher, L.H. (1996). The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85, 973-983.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. und Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Ise, W., Kohyama, M., Schraml, B.U., Zhang, T., Schwer, B., Basu, U., Alt, F.W., Tang, J., Oltz, E.M., Murphy, T.L. und Murphy, K.M. (2011). The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol* 12, 536-543.
- Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X., Gilliet, M. und Liu, Y.J. (2008). Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28, 870-880.
- Jenkins, M.K., Chu, H.H., McLachlan, J.B. und Moon, J.J. (2010). On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annu Rev Immunol* 28, 275-294.

- Johnston, R.J., Choi, Y.S., Diamond, J.A., Yang, J.A. und Crotty, S. (2012). STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med* 209, 243-250.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J. und Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325, 1006-1010.
- Kallinich, T., Beier, K.C., Gelfand, E.W., Kroczeck, R.A. und Hamelmann, E. (2005). Co-stimulatory molecules as potential targets for therapeutic intervention in allergic airway disease. *Clin Exp Allergy* 35, 1521-1534.
- Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A. und Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 10, 176-184.
- Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H. und Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34, 947-960.
- Khayyamian, S., Hutloff, A., Buchner, K., Grafe, M., Henn, V., Kroczeck, R.A. und Mages, H.W. (2002). ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6198-6203.
- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L. und Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* 193, 1373-1381.
- King, C., Tangye, S.G. und Mackay, C.R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 26, 741-766.
- King, I.L. und Mohrs, M. (2009). IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J Exp Med* 206, 1001-1007.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T. und Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34, 961-972.
- Kroczeck, R.A., Mages, H.W. und Hutloff, A. (2004). Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* 16, 321-327.
- Kwon, H., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, H.P., Oh, J., Tunyaplin, C., Carotta, S., Donovan, C.E., Goldman, M.L., Tailor, P., *et al.* (2009). Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* 31, 941-952.
- Laszlo, G., Hathcock, K.S., Dickler, H.B. und Hodes, R.J. (1993). Characterization of a novel cell-surface molecule expressed on subpopulations of activated T and B cells. *J Immunol* 150, 5252-5262.
- Le, T.V., Kim, T.H. und Chaplin, D.D. (2008). Intracloonal competition inhibits the formation of high-affinity antibody-secreting cells. *J Immunol* 181, 6027-6037.
- Lesniewski, M.L., Haviernik, P., Weitzel, R.P., Kadereit, S., Kozik, M.M., Fanning, L.R., Yang, Y.C., Hegerfeldt, Y., Finney, M.R., Ratajczak, M.Z., *et al.* (2008). Regulation of IL-2 expression by transcription factor BACH2 in umbilical cord blood CD4+ T cells. *Leukemia* 22, 2201-2207.
- Liang, L., Porter, E.M. und Sha, W.C. (2002). Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J Exp Med* 196, 97-108.
- Ling, V., Wu, P.W., Finnerty, H.F., Bean, K.M., Spaulding, V., Fouser, L.A., Leonard, J.P., Hunter, S.E., Zollner, R., Thomas, J.L., *et al.* (2000). Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol* 164, 1653-1657.

- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J. und Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 207, 353-363.
- Liu, X., Yan, X., Zhong, B., Nurieva, R.I., Wang, A., Wang, X., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Chang, S.H., Esplugues, E., *et al.* (2012). Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J Exp Med*.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Löhning, M., Hutloff, A., Kallinich, T., Mages, H.W., Bonhagen, K., Radbruch, A., Hamelmann, E. und Kroczeck, R.A. (2003). Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* 197, 181-193.
- Lüthje, K., Kallies, A., Shimohakamada, Y., GT, T.B., Light, A., Tarlinton, D.M. und Nutt, S.L. (2012). The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat Immunol* 13, 491-498.
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M. und Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209, 1241-1253.
- Maag, D., Maxwell, M.J., Hardesty, D.A., Boucher, K.L., Choudhari, N., Hanno, A.G., Ma, J.F., Snowman, A.S., Pietropaoli, J.W., Xu, R., *et al.* (2011). Inositol polyphosphate multikinase is a physiologic PI3-kinase that activates Akt/PKB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1391-1396.
- MacLennan, I.C., Toellner, K.M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M., Zuniga, E., Cook, M.C. und Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194, 8-18.
- Mages, H.W., Hutloff, A., Heuck, C., Buchner, K., Himmelbauer, H., Oliveri, F. und Kroczeck, R.A. (2000). Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur J Immunol* 30, 1040-1047.
- Mak, T.W., Shahinian, A., Yoshinaga, S.K., Wakeham, A., Boucher, L.M., Pintilie, M., Duncan, G., Gajewska, B.U., Gronski, M., Eriksson, U., *et al.* (2003). Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol* 4, 765-772.
- Martins, G. und Calame, K. (2008). Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 26, 133-169.
- McAdam, A.J., Chang, T.T., Lumelsky, A.E., Greenfield, E.A., Boussiotis, V.A., Duke-Cohan, J.S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V.K., *et al.* (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* 165, 5035-5040.
- McAdam, A.J., Greenwald, R.J., Levin, M.A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G.J. und Sharpe, A.H. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409, 102-105.
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N. und McHeyzer-Williams, L. (2012). Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* 12, 24-34.
- McIntyre, T.M., Klinman, D.R., Rothman, P., Lugo, M., Dasch, J.R., Mond, J.J. und Snapper, C.M. (1993). Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *J Exp Med* 177, 1031-1037.
- Menßen, A., Edinger, G., Grun, J.R., Haase, U., Baumgrass, R., Grutzkau, A., Radbruch, A., Burmester, G.R. und Haupl, T. (2009). SiPaGene: A new repository for instant online retrieval, sharing and meta-analyses of GeneChip expression data. *BMC Genomics* 10, 98.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O. und Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-18476.

- Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., *et al.* (2007). Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol Cell Biol* 27, 3008-3022.
- Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H. und Galli, S.J. (2007). Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 81, 1258-1268.
- Nakayamada, S., Kanno, Y., Takahashi, H., Jankovic, D., Lu, K.T., Johnson, T.A., Sun, H.W., Vahedi, G., Hakim, O., Handon, R., *et al.* (2011). Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity* 35, 919-931.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q. und Dong, C. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138-149.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H. und Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001-1005.
- Nurieva, R.I., Chuvpilo, S., Wieder, E.D., Elkon, K.B., Locksley, R., Serfling, E. und Dong, C. (2007). A costimulation-initiated signaling pathway regulates NFATc1 transcription in T lymphocytes. *J Immunol* 179, 1096-1103.
- Nurieva, R.I., Duong, J., Kishikawa, H., Dianzani, U., Rojo, J.M., Ho, I., Flavell, R.A. und Dong, C. (2003a). Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 18, 801-811.
- Nurieva, R.I., Mai, X.M., Forbush, K., Bevan, M.J. und Dong, C. (2003b). B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14163-14168.
- Nurieva, R.I., Podd, A., Chen, Y., Alekseev, A.M., Yu, M., Qi, X., Huang, H., Wen, R., Wang, J., Li, H.S., *et al.* (2012). STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *J Biol Chem* 287, 11234-11239.
- O'Shea, J.J. und Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098-1102.
- Oestreich, K.J., Mohn, S.E. und Weinmann, A.S. (2012). Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat Immunol* 13, 405-411.
- Ortega, G., Robb, R.J., Shevach, E.M. und Malek, T.R. (1984). The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J Immunol* 133, 1970-1975.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.P., Wang, G., Qi, C.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., *et al.* (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 173, 5361-5371.
- Özkaynak, E., Gao, W., Shemmeri, N., Wang, C., Gutierrez-Ramos, J.C., Amaral, J., Qin, S., Rottman, J.B., Coyle, A.J. und Hancock, W.W. (2001). Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol* 2, 591-596.
- Parry, R.V., Rumbley, C.A., Vandenberghe, L.H., June, C.H. und Riley, J.L. (2003). CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 171, 166-174.
- Pepper, M., Pagan, A.J., Igyarto, B.Z., Taylor, J.J. und Jenkins, M.K. (2011). Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* 35, 583-595.

- Poholek, A.C., Hansen, K., Hernandez, S.G., Eto, D., Chandele, A., Weinstein, J.S., Dong, X., Odegard, J.M., Kaech, S.M., Dent, A.L., *et al.* (2010). In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol* *185*, 313-326.
- Reichert, R.A., Gallatin, W.M., Weissman, I.L. und Butcher, E.C. (1983). Germinal center B cells lack homing receptors necessary for normal lymphocyte recirculation. *J Exp Med* *157*, 813-827.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F. und Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* *412*, 300-307.
- Reinhardt, R.L., Liang, H.E. und Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* *10*, 385-393.
- Reth, M., Imanishi-Kari, T. und Rajewsky, K. (1979). Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in C 57 BL/6 mice by cell fusion. II. Characterization of idiotopes by monoclonal anti-idiotope antibodies. *Eur J Immunol* *9*, 1004-1013.
- Rolf, J., Bell, S.E., Kovsdi, D., Janas, M.L., Soond, D.R., Webb, L.M., Santinelli, S., Saunders, T., Hebeis, B., Killeen, N., *et al.* (2010). Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J Immunol* *185*, 4042-4052.
- Rudd, C.E. und Schneider, H. (2003). Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* *3*, 544-556.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A. und Jones, P.A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* *9*, 435-443.
- Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P. und Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* *192*, 1553-1562.
- Schwickert, T.A., Lindquist, R.L., Shakh, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M.H., Dustin, M.L. und Nussenzweig, M.C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* *446*, 83-87.
- Sebzda, E., Zou, Z., Lee, J.S., Wang, T. und Kahn, M.L. (2008). Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nat Immunol* *9*, 292-300.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K. und Staudt, L.M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* *17*, 51-62.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., *et al.* (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* *21*, 81-93.
- Sharpe, A.H. (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* *229*, 5-11.
- Snapper, C.M. und Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* *236*, 944-947.
- Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y., Ishii, T., Sugimoto, M., Araki, S., Tominaga, A., Yamaguchi, N. und Takatsu, K. (1989). Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* *170*, 1415-1420.
- Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D. und Rajewsky, K. (1997). B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity* *6*, 225-233.
- Spolski, R. und Leonard, W.J. (2008). Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* *26*, 57-79.

- Swallow, M.M., Wallin, J.J. und Sha, W.C. (1999). B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity* 11, 423-432.
- Tafari, A., Shahinian, A., Bladt, F., Yoshinaga, S.K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L.M., Bouchard, D., Chan, V.S., Duncan, G., *et al.* (2001). ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409, 105-109.
- Takahashi, N., Matsumoto, K., Saito, H., Nanki, T., Miyasaka, N., Kobata, T., Azuma, M., Lee, S.K., Mizutani, S. und Morio, T. (2009). Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 182, 5515-5527.
- Tan, A.H., Goh, S.Y., Wong, S.C. und Lam, K.P. (2008). T helper cell-specific regulation of inducible costimulator expression via distinct mechanisms mediated by T-bet and GATA-3. *J Biol Chem* 283, 128-136.
- Tarlinton, D. (2006). B-cell memory: are subsets necessary? *Nat Rev Immunol* 6, 785-790.
- Taylor, A., Akdis, M., Joss, A., Akkoc, T., Wenig, R., Colonna, M., Daigle, I., Flory, E., Blaser, K. und Akdis, C.A. (2007). IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J Allergy Clin Immunol* 120, 76-83.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A. und Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547.
- Tomonari, K. (1988). A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28, 455-458.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S. und Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488-1492.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M. und Calame, K.L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173, 1158-1165.
- Turner, C.A., Jr., Mack, D.H. und Davis, M.M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297-306.
- Turner, M.L., Corcoran, L.M., Brink, R. und Hodgkin, P.D. (2010). High-affinity B cell receptor ligation by cognate antigen induces cytokine-independent isotype switching. *J Immunol* 184, 6592-6599.
- Veerman, K.M., Williams, M.J., Uchimura, K., Singer, M.S., Merzaban, J.S., Naus, S., Carlow, D.A., Owen, P., Rivera-Nieves, J., Rosen, S.D. und Ziltener, H.J. (2007). Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 8, 532-539.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L. und Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592-605.
- Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K.M., Yu, D., Domaschek, H., Whittle, B., Lambe, T., *et al.* (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435, 452-458.
- Vogelzang, A., McGuire, H.M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C.R. und King, C. (2008). A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29, 127-137.
- Warnatz, K., Bossaller, L., Salzer, U., Skrabl-Baumgartner, A., Schwinger, W., van der Burg, M., van Dongen, J.J., Orlowska-Volk, M., Knoth, R., Durandy, A., *et al.* (2006). Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 107, 3045-3052.

- Watanabe, M., Nakajima, S., Ohnuki, K., Ogawa, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Murakami, Y., Tanabe, K. und Abe, R. (2012). AP-1 is involved in ICOS gene expression downstream of TCR/CD28 and cytokine receptor signaling. *Eur J Immunol* *42*, 1850-1862.
- Watanabe, M., Takagi, Y., Kotani, M., Hara, Y., Inamine, A., Hayashi, K., Ogawa, S., Takeda, K., Tanabe, K. und Abe, R. (2008). Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses. *J Immunol* *180*, 5222-5234.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H. und Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* *270*, 985-988.
- Weber, J.P., Fuhrmann, F. und Hutloff, A. (2012). T-follicular helper cells survive as long-term memory cells. *Eur J Immunol* *42*, 1981-1988.
- Weinreich, M.A., Takada, K., Skon, C., Reiner, S.L., Jameson, S.C. und Hogquist, K.A. (2009). KLF2 transcription-factor deficiency in T cells results in unrestrained cytokine production and upregulation of bystander chemokine receptors. *Immunity* *31*, 122-130.
- Wong, S.C., Oh, E., Ng, C.H. und Lam, K.P. (2003). Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7-H2. *Blood* *102*, 1381-1388.
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* *16*, 161-170.
- Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., *et al.* (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* *402*, 827-832.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., *et al.* (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* *31*, 457-468.
- Yu, D., Tan, A.H., Hu, X., Athanasopoulos, V., Simpson, N., Silva, D.G., Hutloff, A., Giles, K.M., Leedman, P.J., Lam, K.P., *et al.* (2007). Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* *450*, 299-303.
- Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., Ditoro, D., Hansen, K., Barnett, B. und Crotty, S. (2010). Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* *185*, 190-202.
- Zaretsky, A.G., Taylor, J.J., King, I.L., Marshall, F.A., Mohrs, M. und Pearce, E.J. (2009). T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* *206*, 991-999.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U. und Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* *458*, 351-356.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.M., Smyth, M.J., *et al.* (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* *207*, 365-378.
- Zou, Y.R., Takeda, S. und Rajewsky, K. (1993). Gene targeting in the Ig kappa locus: efficient generation of lambda chain-expressing B cells, independent of gene rearrangements in Ig kappa. *EMBO J* *12*, 811-820.

8 Abkürzungsverzeichnis

A647	Alexa Fluor 647
A700	Alexa Fluor 700
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cy7
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Bio	Biotin
B. pert.	Bordetella pertussis
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B-Zellrezeptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFA	komplettes Freund's Adjuvanz (<i>Freund's Adjuvant complete</i>)
CFSE	5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
Cy5	Cyanin-5
DAPI	4',6-Diamino-2-Phylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FAM	6-Carboxyfluorescein
FC	n-fache Regulation (<i>fold change</i>)
FCS	fötale Kälberserum
FDZ	follikuläre Dendritische Zelle
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLICA	Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Caspase-Inhibitor (<i>fluorochrome inhibitor of caspases</i>)
GC	Keimzentrum (<i>germinal center</i>)
GC B-Zelle	Keimzentrums-B-Zelle
h	Stunde
HPCDA	<i>high-performance chip data analysis</i>

ICOS	Induzierbarer Kostimulator
ICOS-L	Induzierbarer Kostimulator Ligand
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ingLN	inguinale Lymphknoten
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KLH	Keyhole-Limpet-Hämocyanin
KO	<i>knock-out</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LN	Lymphknoten
MACS	magnetische Zellsortierung
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher (<i>nonfluorescent Quencher</i>)
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHCII	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse II (<i>major histocompatibility complex class II</i>)
miRNA	micro-RNA
NP	Nitrophenol
NP-OVA	Nitrophenol-gekoppeltes Ovalbumin
OVA	Ovalbumin
PacB	Pacific Blue
PacO	Pacific Orange
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PNA	Erdnuss Agglutinin (<i>peanut agglutinin</i>)
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)

TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine
T _{FH} -Zelle	follikuläre T-Helferzelle
tg	transgen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor
UTR	untranslatierte Region (<i>untranslated region</i>)
vs.	versus
WT	Wildtyp

9 Publikationen

Originalpublikationen

Franke, R.K., Weber J.P., Fuhrmann, F., Vu Van, D., Burmeister, Y., Hutloff, A. The inducible costimulator ICOS in the regulation of T follicular helper cells. Manuskript in Vorbereitung.

Vu Van, D., Beier, K.C., **Franke, R.K.**, Gurka, S., Hamelmann, E., Kroczeck, R.A., Hutloff, A. Role of ICOS for the local interaction of antigen-specific T and B cells in inflamed lung tissue. Manuskript in Vorbereitung.

Kongressbeiträge

Vu Van, D. *, **Franke, R.K.**, Burmeister, Y., Kroczeck, R.A., Beier, K.C., Hutloff, A. A novel mouse airway inflammation model to study interaction of allergen-specific T and B cells. *2nd European Congress of Immunology*, 13. – 16. Sept. 2009, Berlin, Deutschland (Poster).

Vu Van, D., **Franke, R.K.**, Beier, K.C., Hutloff, A. *. Effector functions of antigen-specific T and B cells in a chronic airway inflammation model. *9th B Cell Forum*, 31. März – 2. April 2011, Bad Sooden-Allendorf, Deutschland (Poster)

Franke, R.K. *, Weber, J.P., Fuhrmann, F., Vu Van, D., Burmeister, Y., Hutloff, A. The relevance of the inducible costimulator ICOS for T follicular helper cells. *Joint Annual Meeting SIICA-DGfI*, 28. Sept. – 1. Okt. 2011, Riccione, Italien (Vortrag)

Vu Van, D., **Franke, R.K.**, Beier, K.C., Hutloff, A. *. The role of the inducible costimulator ICOS for local T/B cell cooperation in a murine model of allergic airway inflammation. *Joint Annual Meeting SIICA-DGfI*, 28. Sept. – 1. Okt. 2011, Riccione, Italien (Vortrag)

Franke, R.K., Weber, J.P., Fuhrmann, F., Vu Van, D., Burmeister, Y., Hutloff, A. *. ICOS in the regulation of antigen-specific B cell responses. *10th B Cell Forum*, 5. – 7. März 2012, Kloster Banz, Deutschland (Vortrag)

Vu Van, D. *, **Franke, R.K.**, Beier, K.C., Hutloff, A. The role of the inducible costimulator ICOS for local T/B cell cooperation in a murine model of allergic airway inflammation. *10th B Cell Forum*, 5. – 7. März 2012, Kloster Banz, Deutschland (Poster)

Franke, R.K. *, Weber, J.P., Fuhrmann, F., Vu Van, D., Burmeister, Y., Hutloff, A. The inducible costimulator ICOS in the regulation of T follicular helper cells. *3rd European Congress of Immunology*, 5. – 8. Sept. 2012, Glasgow, Schottland (Vortrag)

Vu Van, D. *, **Franke, R.K.**, Al Baz, M.S., KroczeK, R.A., Hamelmann, E., Beier, K.C., Hutloff, A. Local interaction of antigen-specific T and B cells in chronically inflamed lung tissue. *3rd European Congress of Immunology*, 5. – 8. Sept. 2012, Glasgow, Schottland (Vortrag)

* präsentierender Autor

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.