

**Regulation und Funktion des ICOS-Liganden
auf murinen Dendritischen Zellen**

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

Manuel Ganser
aus Krefeld

April, 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Richard Kroczek
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Blankenstein

Disputation am: 30.08.2007

Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
APC	Allophycocyanin
APES	Aminopropyltriethoxysilan
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
APZ	Antigenpräsentierende Zelle(n)
BZ	B-Zelle
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV	Zytomegalovirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dublecoo's Modified Eagle Medium
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	<i>Ethyldiamine Tetra-acetic Acid</i>
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbend Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
Fc	Konstantes Antikörperfragment
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

Abkürzungen

geo. M.	Geometrischer Mittelwert
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
gp	Glykoprotein
GVHD	<i>Graft versus host disease</i>
HCMV	Humanes Zytomegalovirus
HIV	<i>Human Immundeficiency Virus</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
ICOS	<i>Inducible Costimulator</i>
ICOS-L	<i>Inducible Costimulator-Ligand</i>
iFACS	Intrazelluläre Durchflusszytometrie
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
KO-Maus	<i>Knock-out</i> Maus
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MCMV	Murines Zytomegalovirus
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex

Abkürzungen

MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n.d.	Nicht detektierbar
NKZ	Natürliche Killerzelle
Ova	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pDZ	Plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll a
Pfu	Plauebildende Einheit
pl:C	Poly I :C
pp	Phosphoprotein
RT	Raumtemperatur
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor
TMB	Tetramethylbenzidindihydrochlorid
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TZ	T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
vgl.	Vergleiche
VSB	Virus-Standardpuffer
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WT	Wildtyp

Abbildungen und Tabellen

Abb.	Titel	Seite
1	Aufbau des <i>Herpesviridae</i> -Virions (schematisch)	9
2	Aufreinigung muriner DZ aus der Milz	39
3	Zeitkinetik der Expression von ICOS-L und anderen B7-Liganden auf der Zelloberfläche von DZ-Subpopulationen aus der Milz <i>in vitro</i>	41
4	Aufreinigung von Ova-Peptid spezifischen T-Zellen	44
5	Überblick der Kokultur-Ansätze	45
6	Ermittlung der Bedingungen für Kokulturen aus Ova-Peptid spezifischen T-Zellen und Milz-DZ	48
7	Zytokinproduktion in der Kokultur aus antigenspezifischen TZ mit DZ und Peptid nach initialer T-Zell Aktivierung bei Blockade des ICOS/ICOS-L-Signalwegs	49
8	Zytokinproduktion nach Restimulation von antigenspezifischen TZ, die zuvor unter Blockade der ICOS/ICOS-L-Interaktion durch DZ und Peptid primär aktiviert worden sind	51
9	Überprüfung der Kokulturexperimente mit ICOS-defizienten T-Zellen	54
10	Expression von B7-Molekülen auf CD8 α^- und CD8 α^+ DZ nach Inkubation mit Zytokinen und pathogenspezifischen Stimuli im Vergleich mit dem Einfluss der spontanen Aktivierung in Medium	56
11	MCMV-infizierte DZ regulieren ICOS-L herunter	58
12	MCMV Deletionsmutanten können primäre murine DZ nur schlecht infizieren	60
13	Die Infektion der NIH 3T3 ICOS-L-Transfektanten mit dem Wildtypvirus MW97.01 reduziert die ICOS-L-Expression auf der Zelloberfläche	61
14	Die MCMV Deletionsmutante $\Delta 20$ kann ICOS-L nicht von der Zelloberfläche von NIH 3T3 ICOS-L Transfektanten herunterregulieren	62
15	Der Fc γ R m138/fcr-1 ist für die Herunterregulation von ICOS-L verantwortlich	63
16	Die Expression von m138 ist ausreichend für die Herunterregulation von ICOS-L auf NIH 3T3-Transfektanten	66
17	Konfokale Analyse der Expression von ICOS-L, m138/fcr-1 und MCMV-GFP in NIH 3T3 ICOS-L Transfektanten 20 h nach Infektion	68

Abb.	Titel	Seite
18	Histologische Analyse infiltrierender Lymphozyten in der Speicheldrüse MCMV-infizierter Mäuse	70
19	Analyse der ICOS-Expression von TZ in der Speicheldrüse MCMV-infizierter Mäuse	72
20	ICOS-Defizienz führt zu einer verzögerten Eliminierung von produktivem Virus aus infizierten Organen	74

Tabelle	Titel	Seite
1	Expression kostimulatorischer Moleküle und ihrer Liganden	5
2	Übersicht der MACS Sortierung	20
3	Übersicht verwendeter Zelllinien und Transfektanten	22
4	Reagenzien zur <i>in vitro</i> Stimulation von DZ	23
5	Übersicht verwendeter Antikörperpaare im ELISA	24
6	Übersicht der in den Kokulturen verwendeten Blockadereagenzien	26
7	Übersicht der FACS-Antikörper und Reagenzien	27
8	Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie	28
9	Übersicht der in der Histologie verwendeten Antikörper	31
10	Übersicht der in der Histologie verwendeten Detektionsreagenzien	32
11	Übersicht verwendeter Viren	33
12	Übersicht der in den Kokulturen verwendeten Blockadereagenzien und Kontrollen	46
13	Übersicht der rekombinanten MCMV (-mutanten)	59

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	i
Abbildungen und Tabellen	iv
Inhaltsverzeichnis	vi
I Einleitung	1
I.1 Die Aktivierung einer antigenspezifischen Immunantwort	1
I.1.1 Kostimulation von T-Zellen.....	3
I.1.2 ICOS und ICOS-Ligand.....	6
I.2 Modulation von Immunantworten durch Pathogene, insbesondere Herpesviren	8
I. 2.1 Zytomegaloviren (CMV)	10
I.2.2 Immunmodulation im Modell des murinen Zytomegalovirus (MCMV)	12
I.3 Ziele der Arbeit	15
II Material und Methoden	17
II.1 Geräte, Material und Chemikalien	17
II.1.1 Geräte	17
II.1.2 Material und Chemikalien.....	17
II.2 Verwendete Tiere	17
II.3 Puffer, Medien und Lösungen.....	18
II.4 Zellbiologische Methoden	19
II.4.1 Aufreinigung muriner Milzzellen	19
II.4.2 Aufreinigung muriner Speicheldrüsenzellen	19
II.4.3 Reinigung von Zellen durch MACS	19
II.4.4 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus der Milz	21
II.4.5 Isolierung embryonaler Fibroblasten der Maus	21
II.4.6 Zelllinien	22
II.4.7 Kultur und Kryokonservierung von permanenten Zelllinien	22
II.4.8 Kultur primärer muriner DZ	23
II.4.9 ELISA	24
II.4.10 Bioplex (Cytometric Bead Assay)	25
II.4.11 Kokultur von TZ mit DZ	25

II.5 Durchflusszytometrie (FACS)	26
II.5.2 Analyse intrazellulärer Antigene in der Durchflusszytometrie (iFACS)	30
II.6 Histologie	30
II.6.1 Kryokonservierung/ Kryoschnitte	30
II.6.2 Fixierung von Kryoschnitten	30
II.6.3 Blocken endogener Peroxidase	30
II.6.4 Detektion	31
II.6.5 Peroxidase-Protokoll	32
II.7 Immunfluoreszenzmikroskopie	32
II.8 Virologie.....	33
II.8.1 Viren und Virusmutanten.....	33
II.8.2 Herstellung von ungereinigten Virenstocks <i>in vivo</i>	34
II.8.3 Herstellung und Aufreinigung von Virenstocks aus Zellkultur	34
II.8.4 Plaque-Assay zur Quantifizierung von produktivem MCMV	35
II.8.5 <i>In vitro</i> Infektion von Zellen mit MCMV.....	36
II.8.6 Infektion von Mäusen mit MCMV	36
II.8.7 Isolation von MCMV aus Organen zur Titerbestimmung.....	36
II.9 Molekularbiologie.....	36
II.9.1 Transfektion von Zelllinien	36
II.9.2 Plasmide	37
III Ergebnisse	38
III.1 Expressionsanalyse des ICOS-L auf Subpopulationen von murinen Dendritischen Zellen (DZ).....	38
III.1.1 Etablierung einer Methode zum Anreichern von murinen DZ aus sekundärem lymphatischem Gewebe	39
III.1.2 Murine DZ regulieren ICOS-L nach Aktivierung <i>in vitro</i> auf der Zelloberfläche herauf	40
III.2 Das ICOS/ICOS-L System beeinflusst bei der T-Zell Aktivierung durch DZ die Differenzierung der T-Zellen	43
III.2.1 Aufbau eines <i>in vitro</i> Kokultursystems für die Analyse der Rolle des ICOS/ICOS-L-Systems bei einer antigenspezifischen Immunantwort.....	44

III.2.3 Die Blockade des ICOS-Signalwegs während der primären Stimulation naiver antigenspezifischer T-Zellen führt zu einer erhöhten Produktion von IFN- γ und IL-10.....	48
III.2.4 Die Blockade des ICOS-Signalwegs während der primären Stimulation naiver, antigenspezifischer T-Zellen führt nach Restimulation dieser Zellen zu einer erhöhten Produktion von IFN- γ und einer reduzierten Produktion von IL-4.....	50
III.2.5 Überprüfung der Ergebnisse der Kokultorexperimente mit ICOS-defizienten, antigenspezifischen T-Zellen	51
III.3 Regulation des ICOS-L auf murinen DZ	55
III.3.1 Die ICOS-L-Expression auf DZ wird durch Zytokine und pathogenspezifische Stimuli beeinflusst.....	55
III.3.2 Die ICOS-L-Expression auf DZ wird durch Infektion mit dem Murinen Zytomegalovirus (MCMV) herunterreguliert	57
III.3.3 Der Faktor für die Herunterregulation von ICOS-L auf infizierten Zellen ist viral codiert und liegt in der Region m128-m139	58
III.3.4 Der virale Fc-Rezeptor m138/fcr-1 ist für die Herunterregulation von ICOS-L notwendig.....	62
III.3.5 Die Expression des viralen Fc-Rezeptors m138/fcr-1 ist ausreichend für die Herunterregulation von ICOS-L.....	64
III.3.6 ICOS-L und fcr-1/m138 sind bei gleichzeitiger Expression intrazellulär kolokalisiert	66
III.4 Der ICOS-Signalweg ist essenziell für eine effektive Immunantwort gegen eine MCMV-Infektion <i>in vivo</i>	69
III.4.1 ICOS-exprimierende T-Zellen infiltrieren MCMV-infiziertes Gewebe	69
III.4.2 ICOS-Defizienz führt zu einem Defekt der Viruselimination aus Milz und Speicheldrüse	72
IV Diskussion	75
IV.1 ICOS-L wird auf murinen primären DZ exprimiert	76
IV.2 Die ICOS/ICOS-L-Interaktion beeinflusst die Differenzierung von TZ	77

IV.3 Die ICOS-L-Expression auf DZ wird durch Zytokine und pathogenspezifische Stimuli beeinflusst	81
IV.4 der virale Fcγ-R m138/fcr-1 moduliert die ICOS-L-Expression auf MCMV-infizierten Zellen	83
IV.5 ICOS ist wichtig für die Bekämpfung einer MCMV-Infektion	86
V Zusammenfassung	89
V Summary	90
VI Referenzen	91
VII Anhang	101
VII.1 Publikationen aus dieser Arbeit	101
VII.2 Bescheinigung.....	101
VII.3 Danksagung	102