

## I Einleitung

### I.1 Die Aktivierung einer antigenspezifischen Immunantwort

Für eine effektive, antigenspezifische Immunantwort ist die selektive Aktivierung und schnelle Vermehrung spezifischer Effektorzellen, der T-Zellen (TZ), notwendig. Dafür sind mindestens ein Signal über den antigenspezifischen Rezeptorkomplex (T-Zell Rezeptorkomplex, TZR) dieser Zellen und weitere kostimulatorische Signale erforderlich. Diese werden durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie Dendritischen Zellen (DZ), Makrophagen oder B-Zellen (BZ) vermittelt, die Peptide von Antigenen im Kontext mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“, MHC) auf der Zelloberfläche gebunden präsentieren und zudem Liganden für TZ-kostimulatorische Moleküle exprimieren. Aufgrund der starken Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-Molekülen sind aktivierte DZ unter den professionellen APZ besonders effektiv in der Aktivierung naiver, Antigen unerfahrener TZ. DZ sind eine über den gesamten Körper verteilte, aus dem Knochenmark stammende Gruppe von Leukozyten, die auf die Aufnahme, den Transport, die Verarbeitung und die Präsentation von Antigenen an TZ spezialisiert sind (Übersichtsartikel: Shortman *et al.*, 2002). Sie befinden sich in peripheren Organen in einem „unreifen“ Zustand, wo sie ständig die Antigene der Umgebung aufnehmen. DZ exprimieren invariante Muster-Erkennungs-Rezeptoren, die Spezifität für pathogen-assoziierte Faktoren, wie z.B. LPS, als Bestandteil bakterieller Zellwände besitzen. Dazu gehören z. B. die „Toll-like Rezeptoren“ (TLR). Durch diese Rezeptoren wird die Erkennung von Pathogenen und z. B. Signalmolekülen, die von gestressten Zellen ausgeschüttet wurden, gewährleistet. Die Konfrontation von DZ mit diesen „Gefahrensignalen“ stimuliert die „Reifung“ der DZ. Sie wandern in sekundäre lymphatische Organe ein, prozessieren verstärkt Antigene und präsentieren sie als Peptide. Außerdem werden Liganden T-Zell-kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche verstärkt exprimiert und die DZ produzieren selbst Zytokine, wie z. B. IL-12. In den sekundären lymphatischen Organen aktivieren die

ausgereiften DZ antigenspezifische TZ und lösen somit eine adaptive Immunantwort aus. Sie können auch die Art der initiierten Immunantwort beeinflussen, indem sie durch lösliche oder membrangebundene Moleküle die Differenzierung von speziellen T-Helfer- (Th) Zellpopulationen steuern. Man kann Subpopulationen von DZ anhand ihrer unterschiedlichen Expression von Liganden für kostimulatorische Moleküle, von Differenzierungs- oder Aktivierungsmolekülen sowie von Lektinen und „Mustererkennungsrezeptoren“ wie TLR unterscheiden. Diese Unterschiede führen zu einer differenzierten Reaktion der Zellen auf Pathogene und zur selektiven Produktion von Signalmolekülen, die die TZ-Differenzierung beeinflussen. Zudem beinhalten verschiedene Gewebe unterschiedliche Zusammensetzungen an DZ-Subtypen (Übersichtsartikel: Jong *et al.*, 2005).

TZ erfüllen sehr viele Funktionen bei der Bekämpfung einer Infektion durch das adaptive Immunsystem. Dazu gehört die Identifikation und Eliminierung virusinfizierter Zellen durch CD8<sup>+</sup>-, zytotoxische TZ. CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen aktivieren weitere Zellen des Immunsystems (BZ, Makrophagen) und prägen durch ihr Zytokinprofil die Ausrichtung der Immunantwort. Man kann zwischen einer zellvermittelten Immunantwort mit spezieller Wirkung gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren oder bestimmte Bakterien und Protozoen (Th1-Orientierung) und einer Immunantwort, die sich speziell gegen extrazelluläre Erreger richtet, wie z. B. viele Parasiten, Pilze und auch Bakterien (Th2-Orientierung), unterscheiden (Übersichtsartikel: O'Garra *et al.*, 2000). Eine Th1-gerichtete Immunantwort wird durch die Produktion von IL-12 vermittelt und führt zu einer Aktivierung zytotoxischer TZ, Makrophagen, zur Produktion opsonierender und komplementbindender Immunglobuline (Ig) sowie zur Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und weiteren Zytokinen. Eine Th2-orientierte Immunantwort wird durch die Produktion von IL-4 vermittelt. Sie resultiert in einer Aktivierung eosinophiler und basophiler Granulozyten und in der Produktion neutralisierender Antikörper sowie von IL-4, IL-5 und IL-13. Bei den meisten natürlich vorkommenden Infektionen besteht die Immunantwort aus einer Mischung von Th1- und Th2-polarisierten Reaktionen. Mit diesen

zahlreichen Fähigkeiten verfügen TZ über ein mächtiges Potenzial, das nicht nur Pathogenen, sondern auch dem eigenen Organismus Schaden zufügen könnte. Beispiele für eine Schädigung des eigenen Organismus durch das Immunsystem sind Autoimmunkrankheiten oder Allergien. Daher wird die Aktivierung von TZ strikt und auf vielen verschiedenen Wegen reguliert und gesteuert. Eine wichtige Komponente der Regulation der TZ-Aktivität ist die Kostimulationsabhängigkeit der TZ-Aktivierung und Funktion.

### **I.1.1 Kostimulation von T-Zellen**

TZ-Kostimulatoren sind Moleküle, die TZ alleine nicht funktionell aktivieren können, aber TZR-vermittelte Signale verstärken oder schwächen und damit zur Überschreitung eines für die erfolgreiche Aktivierung nötigen Schwellenwerts positiv oder negativ beitragen (Kroczeck *et al.*, 2003). Normalerweise reicht die Erkennung eines Antigens durch den TZR dafür alleine nicht aus; es sind weitere kostimulatorische Signale von APZ nötig. Diese Notwendigkeit der Beteiligung mehrerer Moleküle an einem Aktivierungsvorgang ist ein wichtiger Kontrollmechanismus für die Auslösung einer antigenspezifischen Immunantwort.

Die meisten bekannten T-Zell Kostimulatoren gehören entweder zur CD28- oder TNF-Familie. Einige davon werden konstitutiv auf TZ exprimiert, die Expression der Mehrheit der bekannten kostimulatorischen Moleküle wird jedoch erst nach Antigenerkennung durch den TZR und nach Aktivierung von TZ induziert. Tabelle I.1 gibt eine Übersicht über Kostimulatoren und ihre Liganden der CD28/B7 und TNF/TNFR-Familie. Es gibt sowohl positiv- (CD80, CD86, ICOS, CD30, OX40, 4-1BB und SLAM), als auch negativ-regulatorische Kostimulatoren (CTLA-4, PD-1, und BTLA). Die Liganden dieser Moleküle werden auf allen professionellen APZ exprimiert. CD80 und CD86, die Liganden von CD28 und CTLA-4, werden ausschließlich auf professionellen APZ exprimiert, die anderen Liganden werden darüber hinaus auch sehr breit auf anderen Zelltypen in peripherem Gewebe exprimiert.

Kostimulatorische Signale spielen sowohl bei der initialen Aktivierung von TZ durch DZ und Antigen in lymphoiden Organen, als auch bei der Reaktivierung antigenerfahrener TZ in der Peripherie durch professionelle und nicht-professionelle APZ eine wichtige Rolle. Man nimmt an, dass die Aktivierung von TZ jeweils von der Summe aller vorhandener stimulatorischer und inhibitorischer Signale abhängt, wobei der TZR die Antigenpezifität der Immunantwort definiert (Übersichtsartikel: Krocze *et al.*, 2004).

T-Zelle <sup>1,2</sup>		APZ								Superfam.
Expr.	Signal	Rezeptor	Ligand	professionell			nicht-professionell			
				DZ	BZ	Mφ	Endo.	Epith.	andere <sup>3</sup>	
KONSTITUTIV	positiv	CD28	B7-1 (CD80)	+	+	+	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	CD28/B7
		CD28	B7-2 (CD86)	+	+	+	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	CD28/B7
		CD27	CD70	+	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
		HVEM	LIGHT	+	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
	negativ	BTLA (CD272)	HVEM	+	+	+	-	-	-	TNF/TNFR
INDUZIERBAR	positiv	ICOS (CD278)	ICOS-L (CD275)	+	+	+	+	+	+	CD28/B7
		CD30	CD30L (CD153)	(-)	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
		OX40 (CD134)	OX40L	+	+	+	+	-	+	TNF/TNFR
		4-1BB <sup>8</sup> (CD137)	4-1BBL	+	+	+	(-)	(-)	+	TNF/TNFR
		SLAM (CD150)	SLAM (CD150)	+	+	+	-	-	-	Ig
	negativ	CTLA-4 (CD152)	B7-1 (CD80)	+	+	+	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	CD28/B7
			B7-2 (CD86)	+	+	+	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	CD28/B7
		PD-1 (CD279)	PD-L1 (CD274)	+	+	+	+	+	+	CD28/B7
			PD-L2	+	-	+	+	+	(-)	CD28/B7
		unbekannt <sup>6</sup>	B7-H3	+	(+)	+	-	+	+	CD28/B7
		unbekannt	B7-H4	(-)	+	+	(-) <sup>7</sup>	(-) <sup>7</sup>	(-) <sup>7</sup>	CD28/B7

**Tab. 1: Expression kostimulatorischer Moleküle und ihrer Liganden  
(aus Kroczeck *et al.*, 2003)**

+, exprimiert; -, nicht exprimiert; (-) or (+), muss genauer untersucht werden; Expr., Expression; Endo., Endothelzelle; Epith., Epithelzelle, unbek., unbekannt.

<sup>1</sup> CD28, CTLA-4, OX-40 und ICOS sind TZ-spezifisch

<sup>2</sup> Alle Mitglieder der TNFR Superfamilie wurden auf aktivierten TZ beschrieben. Allerdings ist die biologische Wirkung unbekannt.

<sup>3</sup> Z. B. Fibroblasten, Myocyten, folliculäre DZ, Neuronen, Keratinocyten

<sup>4</sup> Zumindest im humanen System; einige Berichte zeigen eine Expression von CD80/CD86 auf nicht-lymphoiden Zellen im murinen System.

<sup>6</sup> Einige Arbeiten beschreiben eine positive-regulatorische Funktion des B7-H3-Rezeptors

<sup>7</sup> Northern-Blot-Analysen zeigen eine starke Expression von B7-H4 in peripherem Gewebe, allerdings waren immunhistologische Färbungen mit monoklonalen Antikörpern negativ.

<sup>8</sup> Eine neue Arbeit beschreibt eine negativ-regulatorische Funktion von 4-1BB

### I.1.2 ICOS und ICOS-Ligand

Das ICOS/ICOS-L-System ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. ICOS ist ein zu CD28 und CTLA-4 homologes kostimulatorisches Typ 1 Transmembranprotein. Es besteht aus 199 (Mensch) bzw. 200 (Maus) Aminosäuren. ICOS ist ein glykosyliertes, durch Disulfid-Brücken vernetztes Homodimer, bestehend aus je einer Ig-ähnlichen Domäne, einer Transmembran-Region und einem zytoplasmatischem Teil (Rudd *et al.*, 2003), mit einer molekularen Masse von 47-57 kDa (unreduziert; Mages *et al.*, 2000). ICOS wird basal nur sehr schwach auf TZ exprimiert. Nach Aktivierung wird ICOS jedoch innerhalb weniger Stunden auf CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-TZ massiv heraufreguliert, auf CD8<sup>+</sup>-TZ geringer als auf CD4<sup>+</sup>-TZ. ICOS wird auf Effektor- und Gedächtnis-Zellen exprimiert (Yoshinaga *et al.*, 1999; Coyle *et al.*, 2000). Es gibt Berichte über eine ICOS-Expression auf NK-Zellen (Ogasawara *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Totsuka *et al.*, 2003). Signale über ICOS stimulieren die Produktion von Effektor-Zytokinen, die durch CTLA-4-Stimulation inhibiert werden kann (Riley *et al.*, 2001). CD28- und TZR-vermittelte Signale stimulieren die Expression von ICOS (Coyle *et al.*, 2000; Beier *et al.*, 2000; Mages *et al.*, 2000; Mc Adam *et al.*, 2000). ICOS wird sowohl auf Th1-, als auch auf Th2-Zellen während der Differenzierung exprimiert, allerdings auf Th2-Zellen zu einem höheren Level (Coyle *et al.*, 2000; Mc Adam *et al.*, 2000). In der Histologie wurde die Expression von ICOS auf den TZ in Keimzentren und in

den TZ-Zonen der Milz, von Lymphknoten und Peyerschen Plaques detektiert (Beier *et al.*, 2000; Mages *et al.*, 2000).

Der einzige Ligand von ICOS ist ICOS-L (Yoshinaga *et al.*, 1999; Beier *et al.*, 2000; Brodic *et al.*, 2000; Carreno *et al.*, 2002; Sharpe *et al.*, 2002). Er ist ein Mitglied der B7-Familie und ein stark glykosyliertes Typ 1 Membranprotein mit einer molekularen Masse von 63-72 kDa (Khayyamian *et al.*, 2002). ICOS-L wird als Monomer, bestehend aus einer IgV und IgC-ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil, exprimiert. Muriner und humaner ICOS-L wird als Protein in zwei Varianten exprimiert (mGL50 und mGL50b), mit einer Länge von 322 bzw. 347 Aminosäuren, deren Zusammensetzung sich am Ende des zytoplasmatischen Teils unterscheidet (Ling *et al.*, 2001). Beide Varianten werden auf murinen BZ, TZ, Makrophagen und DZ exprimiert. Die mRNA wird konstitutiv in lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben wie Niere, Leber, Peritoneum, Lunge und Hoden exprimiert (Swallow *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2000; Yoshinaga *et al.*, 1999; Brodie *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2001; Yoshinaga *et al.*, 2001). ICOS-L wurde auf der Oberfläche von BZ, Makrophagen, DZ, einer Subpopulation von CD3<sup>+</sup>-TZ und Endothelzellen sowie Epithelzellen detektiert (Swallow *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2000; Yoshinaga *et al.*, 1999; Aicher *et al.*, 2000; Nakazawa *et al.*, 2004). Histologisch wurde ICOS-L in den BZ-Arealen von lymphoiden Organen und in den Follikeln von Milz und Peyerschen Placques detektiert (Yoshinaga *et al.*, 2000).

Kostimulatorische Signale durch ICOS sind für die TZ-vermittelte BZ-Hilfe essentiell (Hutloff *et al.*, 1999; Chapoval *et al.*, 2001; Coyle *et al.*, 2000; Mc Adam *et al.*, 2001; Tafuri *et al.*, 2001). Studien mit Blockadereagenzien der Signaltransduktion, mit transgenen und „knock-out“ (KO) -Mäusen haben die Bedeutung von ICOS bei der BZ-Differenzierung, beim Klassenwechsel der Immunglobuline, der Bildung von Keimzentren und der Entwicklung von B-Gedächtniszellen gezeigt.

Insbesondere für die antikörpervermittelte Immunantwort gegen Viren wie Lymphozytären-Choriomeningitis-Viren (LCMV), Vesicular-Stomatitis-Viren

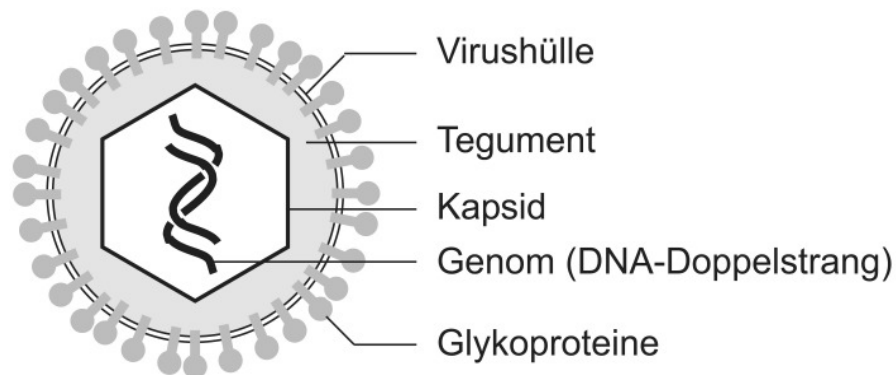
(VSV) und Influenza-Viren spielt die ICOS/ICOS-L-Interaktion eine Rolle (Bertram *et al.*, 2002; Vidric *et al.*, 2005). Eine detaillierte Studie ICOS-defizienter Patienten ergab zudem, dass einige der Patienten neben massiven B-Zell-Defekten an periodisch auftretender Infektion durch Herpes-Simplex-Viren (HSV) oder an persistierender Infektion durch Papilloma-Viren litten (Grimbacher *et al.*, 2003). Verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* haben darüber hinaus gezeigt, dass ICOS die Zytokinproduktion von Th1-, Th2- und regulatorischen T-Zellen stimuliert. Die Funktion von ICOS bei Immunantworten *in vivo* hängt vom Zeitpunkt, von der Phase und den Umgebungsbedingungen der Infektion ab (Überblicksartikel: Greenwald *et al.*, 2005). Über die genaue Funktion der ICOS/ICOS-L-vermittelten Kostimulation bei der Aktivierung von TZ durch DZ ist bisher wenig bekannt. Bei Untersuchungen von aus Monozyten generierten DZ wurde eine selektive Regulation der IL-10 Sekretion durch ICOS/ICOS-L-vermittelte Kostimulation bei der Reaktivierung von Effektor-TZ nachgewiesen (Witsch *et al.*, 2002). Für primäre, humane, Typ I IFN-produzierende, plasmazytoide DZ (pDZ) wurde kürzlich gezeigt, dass das ICOS/ICOS-L-System eine wichtige Rolle bei der Produktion von IL-10 und IL-3 spielt (Janke *et al.*, 2006). Allerdings wurden die TZ bei diesen Experimenten mit Superantigen „unspezifisch“ stimuliert. Es gibt bisher nur einen Bericht, in dem die Rolle von ICOS/ICOS-L-vermittelter Kostimulation bei der Aktivierung antigenspezifischer TZ durch physiologische Signale (Antigen im MHC-Komplex, präsentiert von APZ) untersucht wurde. Dabei wurde mit transgenen Mäusen gearbeitet, die über einen TZR mit Spezifität für Ova-Peptid verfügen. In einem Modell Ova-Peptid-vermittelter Atemwegsentzündung wurde so die Bedeutung der Expression des ICOS-L auf pulmonalen DZ für die Entwicklung regulatorischer T-Zellen gezeigt (Akbari *et al.*, 2002). Eine Expression des ICOS-L auf murinen Milz-DZ wurde beschrieben, aber funktionell noch nicht untersucht (Ling *et al.*, 2001).

### **I.2 Modulation von Immunantworten durch Pathogene, insbesondere Herpesviren**

Bei der Infektion mit Pathogenen steht das Immunsystem in einem zeitlichen Wettbewerb mit der Vermehrung der Pathogene. Eine Modulation des



Immunsystems durch das Pathogen kann daher, auch wenn es nicht zu einem kompletten Ausfall der Immunabwehr führt, ein entscheidender Vorteil für die erfolgreiche Vermehrung sein. Es gibt diverse Beispiele für Strategien von Viren, die Immunabwehr des Wirts zu umgehen. Viren mit einer kurzen Replikationsdauer vermehren sich z. B. sehr rasch und können genügend Nachkommen produzieren, bevor eine vollständige Immunantwort ausgelöst wurde. Andere Viren mit einem langsamen Replikationszyklus manipulieren z. B. infizierte Zellen gezielt, um die eigene Vermehrung bzw. langfristige Persistenz im Organismus zu sichern. Zu solchen Pathogenen gehören die Vertreter der Virus-Familie der *Herpesviridae*. Etwa 130 verschiedene human- und tierpathogene Herpesviren wurden bislang identifiziert. Dazu gehören das Herpes-Simplex Virus Typ1 (HSV-I), HSV-II, Varizella Zoster Viren (VZV), Epstein Barr-Viren (EBV) und Zytomegaloviren. Herpesviren besitzen - im Vergleich zu anderen Viren ein sehr großes Genom. Es kodiert für viele Enzyme, die am Nukleinsäuremetabolismus, der DNA-Synthese und der Prozessierung von Proteinen beteiligt sind. Es ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben. Zwischen Kapsid und Virushülle befindet sich eine Proteinmatrix, das Tegument (Abb. I.1).



**Abb. 1: Aufbau des Herpesviridae-Virions** (schematisch)

Die Virushülle stammt von der Wirtszelle und enthält virale Glykoproteine. Die Virionen besitzen einen Durchmesser von ca. 120-300 nm. Die DNA-Synthese und der Zusammenbau des Kapsids finden im Zellkern statt. Die Produktion von Viruspartikeln während des lytischen Zyklus endet mit der Lyse der infizierten

Zellen. Eine Infektion mit Vertretern dieser Virusfamilie geht jedoch nicht unbedingt mit der Ausbildung eines Krankheitsbildes einher. Die Infektion mit HSV führt z. B. nur mit unterschiedlicher Regelmäßigkeit zur Entstehung von Lippenblässchen. Es gibt asymptomatische Phasen der Infektion, während der die Lippenblässchen nicht auftreten. Dabei liegt das Virus latent in den Nervenzellen der Ganglien vor.

Die Etablierung einer lebenslangen Persistenz im Organismus ist eine Eigenschaft, die alle Herpesviren besitzen. Die virale Modulation des Immunsystems des Wirtsorganismus ist eine sehr wichtige Voraussetzung dafür. Bei Persistenz des Virus liegt das Genom zirkulär in der Zelle vor und es werden nur wenige, bestimmte Gene exprimiert und keine infektiösen Partikel synthetisiert. Durch verschiedene Faktoren, z. B. die Differenzierung der Wirtszelle oder eine Immunschwäche des Wirts, kann es jedoch zu einer Reaktivierung des Virus kommen. Die Mitglieder der Familie der Herpesviridae werden aufgrund ihres Wirtsspektrums, ihrer Replikationsgeschwindigkeit und Pathogenität in drei Unterfamilien eingeteilt:  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Herpesviren.  $\alpha$ -Herpesviren, wie z. B. HSV-I, HSV-II und VZV, haben einen kurzen Replikationszyklus und ein breites Wirtsspektrum. Während der Latenz persistieren sie in Ganglienzellen.  $\gamma$ -Herpesviren zeigen dagegen ein enges Wirtsspektrum und die Replikationszeiten sind unterschiedlich lang. Sie infizieren Zellen des lymphatischen Systems (BZ und TZ), in denen sie auch latent persistieren.  $\beta$ -Herpesviren wie Zytomegaloviren (CMV) haben ebenfalls ein enges Wirtsspektrum und einen langsamen Vermehrungszyklus. Virale Genome dieser Familie liegen latent in Endothelzellen und in Vorläuferzellen des hämatopoietischen Systems vor. Die Hauptvertreter dieser Unterfamilie sind Zytomegalieviren (CMV). Der Name leitet sich von der Größenzunahme und nukleären bzw. zytoplasmatischen Einschlüssen infizierter Zellen ab.

### **I. 2.1 Zytomegaloviren (CMV)**

CMV gehören zur den  $\beta$ -Herpesviren. (Überblick: Loewendorf, 2005) Das humane CMV (HCMV) ist weit verbreitet (Durchseuchung westlicher Länder: 50-80 %, Entwicklungsländer: 90-100 %). CMV besitzt ein verglichen mit

anderen Herpesviren großes Genom von ca. 230 KB, das für 170-200 Genprodukte kodiert (Chee *et al.*, 1990; Rawlinson *et al.*, 1996). Die Infektion eines gesunden, erwachsenen Menschen verläuft zumeist asymptomatisch. Es kommt jedoch nicht zu einer vollständigen Elimination des Virus, sondern zu einem Übergang in eine Phase persistenter Infektion, die ein Leben lang anhält. Bei einem intakten Immunsystem kommt es zur Etablierung eines Gleichgewichts zwischen produktiver Virusvermehrung und einer Immunantwort. Bei einer Immunschwäche kommt es allerdings zur Vermehrung des Virus und es können Schäden entstehen. Vor allem bei ungeborenen Kindern, AIDS-Patienten oder Transplantat-Empfängern ist eine HCMV-Infektion daher problematisch. Eine Primärinfektion während der Schwangerschaft kann z. B. eine inauterine Infektion des Kindes zur Folge haben, die zu Thrombozytopenie, Hepatosplenomegalie, Hörschäden und Entwicklungsstörungen des zentralen Nervensystems führen kann (Fowler *et al.*, 1992, Stango *et al.*, 1982). Bei AIDS-Patienten führt HCMV zu einer Chorioretinitis, die zur Erblindung führen kann oder zu einer interstitiellen Zytomegalovirus-Pneumonie, die tödlich verlaufen kann. Bei der Knochenmarkstransplantation spielt HCMV wahrscheinlich eine Rolle bei der Auslösung einer Abstoßungsreaktion (*Graft versus Host Disease*, GVHD) (Gibson *et al.*, 1996; Broers *et al.*, 2000).

Aufgrund dieser Problematik ist die gezielte Beeinflussung des wirtseigenen Immunsystems durch das Virus Gegenstand aktueller Forschungen. Ein besseres Verständnis der HCMV-Pathogenese ist Voraussetzung für die Entwicklung von Therapiekonzepten. Ferner bietet die Untersuchung der Immunmodulation durch CMV die Möglichkeit, die Bedeutung der vom Virus manipulierten Faktoren bei einer Immunantwort zu analysieren. Ein sehr gutes Modell für Untersuchungen *in vivo* bietet das murine Pendant des HCMV, das murine Zytomegalovirus (MCMV). Es ist mit dem humanen Virus eng verwandt. Daher kann die MCMV-Infektion von Mäusen als Modellorganismus für das humane System genutzt werden (Hudson *et al.*, 1979).

## **I.2.2 Immunmodulation im Modell des murinen Zytomegalovirus (MCMV)**

MCMV als Modellsystem ermöglicht es, den Verlauf von Infektionen experimentell zu beobachten und relevante Faktoren zu manipulieren bzw. zu analysieren. Der natürliche Infektionsweg von Mäusen ist nicht genau geklärt, allerdings wird eine Verbreitung durch Speichel, in dem bei chronisch infizierten Tieren das Virus nachweisbar ist, und durch Muttermilch sowie sexuelle Übertragung angenommen. Der Eintritt des Virus erfolgt zunächst über Epithelien und im Weiteren hämatogen. Für den Verlauf einer Infektion sind verschiedene Faktoren relevant. Dazu gehören die Infektionsdosis, der Übertragungsweg, die Herkunft des Virus (Zellkultur oder aus Speicheldrüsen isoliert), das Alter, der Immunstatus und der genetische Hintergrund der Maus (Übersichtsartikel: Krmpotic *et al.*, 2003). In immunkompetenten Mäusen wird die Infektion in verschiedenen Stadien durch unterschiedliche Komponenten des Immunsystems bekämpft. Während der ersten akuten Phase sind Effektorzellen der angeborenen Immunität, natürliche Killerzellen (NKZ), entscheidend (Bukowski *et al.*, 1983). Der Aktivierungsstatus von NK-Zellen hängt von der Balance aus aktivierenden und inhibierenden Signalen ab. Zu späteren Zeitpunkten ist hauptsächlich die durch CD8<sup>+</sup>-TZ vermittelte adaptive Immunantwort von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup>-TZ im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup>-TZ die Infektion nach dem Transfer in  $\gamma$ -bestrahlte, MCMV-infizierte Mäuse kontrollieren können (Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1988). CD8<sup>+</sup>-TZ mit Spezifität für Peptide viraler Genprodukte sind während einer Infektion nachweisbar, sie können die Virusreplikation sowie Schäden in Geweben eindämmen und immunsupprimierte Empfängertiere vor einem tödlichen Verlauf der Infektion bewahren (Holtappels *et al.*, 2001, Holtappels *et al.*, 2002). Im Laufe der Infektion bilden sich aus den spezifischen CD8<sup>+</sup>-TZ Gedächtniszellen, die während der latenten Infektion in den lymphatischen Geweben nachgewiesen werden können. Nach einem Transfer sind diese ebenfalls in der Lage, eine CMV-Infektion zu kontrollieren (Holtappels *et al.*, 2000; Podlech *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass diese Gedächtniszellen während der Latenzphase regelmäßig wieder restimuliert werden und für die

Kontrolle des Virus verantwortlich sind (Holtappels *et al.*, 2002). Eine Funktion für CD4<sup>+</sup>-TZ bei der Bekämpfung einer MCMV-Infektion zeigt sich bei der Depletion von CD8<sup>+</sup>-TZ nach Infektion. Die verbliebenen CD4<sup>+</sup>-TZ sind dann noch in der Lage, die MCMV-Infektion zu kontrollieren (Jonjic *et al.*, 1990). Das Antikörperspektrum dieser Mäuse unterscheidet sich von dem Spektrum, das in Gegenwart der CD8<sup>+</sup>-TZ ausgebildet wird. Antikörper alleine sind für die Elimination einer Primärinfektion allerdings nicht essentiell, spielen jedoch bei der Kontrolle einer Reaktivierung eine Rolle (Lucin *et al.*, 1994).

Es sind mehrere Genprodukte von MCMV identifiziert worden, die die infizierten Zellen gezielt manipulieren und so eine rasche Vermehrung und langfristige Persistenz fördern. Zahlreiche Genprodukte verhindern z.B. die Apoptose infizierter Zellen, indem sie die bei der Apoptose ausgelöste Caspasekaskade stören (Skaletskaya *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1995). Die stressbedingte Expression von Liganden für den aktivierenden NKZ-Rezeptor NKG2D (H60, MULT-1 und RAE-1) in infizierten Zellen wird durch virale Gene wie m145, m155 und m152 verhindert (Hasan *et al.*, 2005; Krmpotic *et al.*, 2002; Krmpotic *et al.*, 2005; Lodoen, 2004). Auch die Präsentation von Virus-Peptiden im Kontext mit MHC-I wird durch mehrere MCMV-Gene gestört: gp40, ein Protein das durch das MCMV-Gen m152 kodiert wird, bewirkt ein Zurückhalten der MHC-I Moleküle im ERGIC/cis-Golgi Kompartiment (Ziegler *et al.*, 2000). Damit hat m152 eine duale Funktion, einerseits die Zurückhaltung von MHC-I und andererseits verhindert es die Expression des NKZ-Rezeptors RAE-1. Gp48/m06 bedingt die Degradierung von MHC-I Molekülen in Lysosomen (Reusch *et al.*, 1999). Für das virale Protein gp34, kodiert von m04, wurde eine Interaktion mit MHC-I an der Zelloberfläche nachgewiesen. Alle diese Faktoren verhindern die Interaktion von MHC mit zytotoxischen TZ (Kleijnen *et al.*, 1997). Das Fehlen von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche verursacht normalerweise eine Aktivierung von NKZ (Ljunggren *et al.*, 1985). Dies wird - neben der Herunterregulation aktivierender NKZ-Liganden - noch durch die Expression viraler Proteine auf der Zelloberfläche infizierter Zellen verhindert, die zu zellulärem MHC-I Homologie besitzen und durch NKZ nicht von den zellulären MHC-Molekülen unterschieden werden können (Browne *et al.*, 1992;

Farrell *et al.*, 1997). Des Weiteren exprimiert MCMV einen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptor mit Spezifität für murines IgG1 (m138/fcr-1), der auf der Zelloberfläche und intrazellulär in infizierten Zellen exprimiert wird. Viele  $\alpha$  und  $\beta$ -Herpesviren exprimieren Fc $\gamma$ -Rezeptoren, die IgG-Moleküle spezifisch binden. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt worden. Man nimmt jedoch an, dass sie die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität sowie die Komplementaktivierung während einer Infektion stören und durch das „Wegfangen“ antiviraler Antikörper die Neutralisierung infektiöser Viruspartikel beeinträchtigen (Übersichtsartikel: Budt *et al.*, 2004). Die genaue Funktion dieser viralen Fc-Rezeptoren ist daher Gegenstand aktueller Forschung.

Auch kostimulatorische Moleküle oder deren Liganden bieten einen attraktiven Angriffspunkt für Pathogene, die eine Immunantwort schwächen können. Das Fehlen aktivierender kostimulatorischer Signale, z.B. durch CD28/CD80 und CD86 oder ICOS/ICOS-L, verursacht gravierende Immundefekte (Shahinian *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1994; Freeman *et al.*, 1993; Borriello *et al.*, 1997). DZ sind aufgrund ihrer Schlüsselfunktion bei der Initiation einer Immunantwort ein potenzielles Ziel für die Manipulation kostimulatorischer Moleküle durch Viren. Das wurde für verschiedene Viren wie HIV, Masern und HSV bereits nachgewiesen (Fungier-Vivier *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 1997; Salio *et al.*, 1999).

Die Infektion von humanen und murinen DZ mit MCMV führt zur verminderten Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen sowie von CD80 und CD86. Dadurch wird die Aktivierung von TZ durch den TZR und das kostimulatorische Molekül CD28 inhibiert. Ebenso wird die Sekretion von IL-12 bei Infektion vermindert. Diese Effekte sind durch Reifungsstimuli wie LPS nicht reversibel (Andrews *et al.*, 2001; Mathys *et al.*, 2003; Moutaftsi *et al.*, 2002). In humanen DZ wurde die Inhibition der Expression von Chemokinrezeptoren nachgewiesen, was zu einer reduzierten Migrationsfähigkeit der DZ führt (Moutaftsi *et al.*, 2004). Die Infektion von humanen Monozyten mit HCMV unterbindet ihre Differenzierung in DZ, außerdem wird bei Infektion die Reifung

von Langerhans-Zellen in der Haut verhindert, CD80, CD86 und MHC-Moleküle werden herunterreguliert (Gredmark *et al.*, 2003; Hertel *et al.*, 2003). Kürzlich wurde mit modB7-2 das MCMV Genprodukt identifiziert, das zu der selektiven Herunterregulation von CD86 von der Oberfläche infizierter DZ beiträgt. Dabei handelt es sich um das Produkt des gespleißten Gens m147, 5. Der genaue Mechanismus für diese Herunterregulation ist bislang jedoch unbekannt. Mittlerweile wurden mit ICOS-L, PD-L1, PD-L2, B7-H3 und B7-H4 weitere Liganden für kostimulatorische Moleküle auf TZ beschrieben. Sie umfassen sowohl positiv-, als auch negativ-kostimulatorische Moleküle. Es ist wahrscheinlich, dass auch die Expression dieser Moleküle durch MCMV reguliert wird. Eine Analyse darüber kann Aufschluss über weitere Immunevasionsstrategien von MCMV und damit auch über die Bedeutung der einzelnen kostimulatorischen Signalwege bei einer Infektion mit MCMV geben.

### **I.3 Ziele der Arbeit**

ICOS-L ist der Ligand des kostimulatorischen Moleküls ICOS. Er gehört zur B7-Familie und besitzt Homologie zu CD80 und CD86. Die Expression, Funktion und Regulation des ICOS-L auf primären DZ der Maus ist weitgehend unerforscht. B7-Moleküle sind attraktive Angriffspunkte für Pathogene, die eine Immunantwort ihres Wirts modulieren können. Dazu gehören klinisch relevante Herpesviren, wie das humane Zytomegalovirus (HCMV), und sein murines Pendant MCMV. Die Ziele dieser Arbeit sind daher:

#### **1. Analyse des Expressionsprofils des ICOS-L auf murinen DZ**

Da sich verschiedene Subpopulationen muriner DZ phänotypisch und funktionell unterscheiden, wird das Expressionsprofil des ICOS-L auf DZ-Subpopulationen analysiert.

#### **2. Untersuchung der Funktion des ICOS-L bei TZ-Aktivierung durch DZ**

Es gibt bereits Untersuchungen der Funktion des ICOS-L auf humanen DZ bei der Aktivierung von TZ durch Superantigen, die eine Bedeutung der ICOS/ICOS-L-Interaktion für die Zytokinsekretion nachweisen (Witsch *et al.*, 2002). Daher wird die Funktion des ICOS-L auf DZ bei der Aktivierung von TZ

nun in einem murinen *in vitro* Modell mit TZR-transgenen TZ untersucht, das die Stimulation durch physiologische Signale (Peptid-MHC Komplex und Kostimulation) gewährleistet.

### **3. Analyse der Regulation der ICOS-L-Expression auf murinen DZ durch Zytokine, Pathogen-assoziierte Stimuli und MCMV**

Die Auswirkung einer Aktivierung von TZ wird wahrscheinlich durch die Summe aller stimulatorischen oder inhibitorischen Signale bestimmt. Die Modulation der ICOS-L-Expression auf DZ könnte somit ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle einer Immunantwort sein. Daher wird die Auswirkung verschiedener Faktoren wie Zytokine und pathogen-assoziierten Stimuli auf die ICOS-L-Expression muriner DZ-Subpopulationen untersucht. Ferner wird am Beispiel der MCMV-Infektion der Einfluss eines intakten Pathogens auf die ICOS-L-Expression von DZ untersucht.

Durch diese Arbeit erhoffen wir uns weitere Erkenntnisse über die Funktion des ICOS/ICOS-L-Signalwegs bei Infektionen sowie über die Interaktion von Pathogenen mit dem Immunsystem des Wirts.