

IV Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Expression, Regulation und Funktion des ICOS-L auf Subtypen muriner Dendritischer Zellen (DZ). Bei der Aktivierung antigenspezifischer TZ durch DZ in vitro beeinflusst die TZ-Kostimulation durch das ICOS/ICOS-L-System entscheidend das produzierte Zytokinmuster und damit die Differenzierung der TZ. Zahlreiche Faktoren, die sich auf die Expression des ICOS-L auf DZ auswirken und somit möglicherweise eine Immunantwort modifizieren könnten, wurden identifiziert. Darunter fiel das murine Zytomegalovirus (MCMV) als ein komplexes Pathogen, das die Expression des ICOS-L auf der Zelloberfläche infizierter DZ herunterregulierte, besonders auf. Daher wurde nach Faktoren für die virale Modulation der ICOS-L-Expression gesucht. Durch die systematische Analyse von MCMV-Mutanten konnte das bisher als viraler Fc γ -Rezeptor (Fc γ -R) bekannte Molekül fcr-1/m138 als Regulator der ICOS-L-Expression auf der Oberfläche MCMV-infizierter Zellen identifiziert werden. Die Relevanz des ICOS/ICOS-L-Systems für die Immunantwort bei MCMV-Infektion wurde durch Untersuchungen von ICOS-defizienten Mäusen im MCMV-Infektionsmodell deutlich bestätigt: Sie weisen bei sublethaler MCMV-Infektion gegenüber WT-Tieren eine deutlich verzögerte Eliminierung von produktivem Virus aus infizierten Organen auf. Mit der viralen Modulation der Expression des ICOS-L auf infizierten Zellen durch m138/fcr-1 wurden ein neuer, wichtiger Mechanismus der Immunevasion von MCMV und eine weitere Funktion dieses viralen Fc γ -R identifiziert.

ICOS-L wird in lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen auf zahlreichen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Dazu gehören sowohl professionelle APZ, wie DZ, B-Zellen und Makrophagen, als auch nicht professionelle APZ, wie Endothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyten, eine Subpopulation von T-Zellen und Fibroblasten (Swallow *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2000; Yoshinaga *et al.*, 1999; Aicher *et al.*, 2000; Nakazawa *et al.*, 2004). Die Expression auf DZ wurde bis jetzt ausschliesslich für humane, aus Monozyten generierte DZ (Aicher *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000) und für Langerhans-Zellen in situ gezeigt (Witsch *et*

al., 2002). Im murinen System wurde ICOS-L in einem Modell Ovalbumin-induzierter Atemwegsentszündung auf DZ aus peribronchialen Lymphknoten (Akbari *et al.*, 2002) und auf *ex vivo* isolierten Milz-DZ (Ling *et al.*, 2001) nachgewiesen. Damit ist die Expression und Funktion des ICOS-L auf DZ noch weitgehend unbekannt. Gerade DZ spielen jedoch bei der TZ-Aktivierung eine besondere Rolle, da sie naive, antigenspezifische TZ im Vergleich zu anderen professionellen APZ am effektivsten initial aktivieren können. Außerdem können sie extrazelluläre Antigene im Kontext von MHC-I kreuzpräsentieren und somit eine Immunantwort z.B. gegen Viren, die die DZ nicht selber befallen, initiieren. Dabei lösen DZ nicht nur die Proliferation antigenspezifischer TZ aus, sondern beeinflussen auch deren weitere Entwicklung. Dies kann z. B. zur Ausdifferenzierung von TZ, die über ein bestimmtes Zytokinmuster verfügen (Th1 oder Th2-Polarisierung), führen (Übersichtsartikel: Shortman *et al.*, 2002). Der Bindungspartner des ICOS-L ist ICOS („inducible costimulator“), ein Kostimulator der Ig-Superfamilie mit Homologie zu CD28 und CTLA-4. Die Funktion der Kostimulation von TZ durch ICOS wurde in zahlreichen unterschiedlichen Ansätzen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Allerdings wurde die Rolle des von primären, ICOS-L-exprimierenden DZ als APZ dabei bislang nur ansatzweise analysiert. Daher wurde die Expression und Funktion des ICOS-L auf primären DZ in dieser Arbeit genauer untersucht. Es wurde im murinen System gearbeitet, da die experimentellen Möglichkeiten im Mausmodell vielfältiger sind als im humanen System. Primäre DC können aus vielen Organen von Inzuchtmäusen isoliert werden es stehen antigenspezifische Systeme, d.h. Mäuse mit transgenen T-Zell-Rezeptoren, KO-Mäuse und verschiedene Infektionsmodelle, zur Verfügung.

IV.1 ICOS-L wird auf murinen primären DZ exprimiert

DZ in der Milz von Mäusen lassen sich anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und ihrer Funktion in drei Populationen aufteilen: CD11c^{hi}/CD8 α ⁺-DZ, CD11c^{hi}/CD8 α ⁻-DZ und CD11c^{lo}/CD45RA⁺, plasmazytoide DZ (pDZ) (Übersichtsartikel: Shortman *et al.*, 2002). Die Expression des ICOS-L wurde auf der Ebene dieser DZ-Subpopulationen untersucht. Alle drei Subpopulationen regulieren ICOS-L nach unspezifischer, spontaner Aktivierung in der Zellkultur herauf. Mit dem Fusionsprotein muICOS-hulgG als

Färbereagenz für die Untersuchung im Durchflusszytometer wurde allerdings keine basale Expression des Moleküls detektiert. Analysen mit ICOS-L-spezifischen monoklonalen Antikörpern (HK5.3, MIL666, MIL957) zeigten jedoch auch auf unstimulierten, frisch isolierten DZ eine deutliche Färbung für ICOS-L. Bei der spontanen und unspezifischen Aktivierung der DZ in vitro werden neben ICOS-L weitere Oberflächenmoleküle heraufreguliert. Dazu gehören MHC-II, CD40 und auch die Liganden anderer B7-Moleküle wie CD80, CD86, PD-L1 und PD-L2. Alle diese Moleküle sind an der Aktivierung von T-Zellen (TZ) beteiligt. Innerhalb der DZ-Subpopulationen wird ICOS-L auf pDZ deutlich geringer exprimiert als auf CD11c^{hi}/CD8 α ⁺- und CD11c^{hi}/CD8 α ⁻DZ. Damit verhält sich ICOS-L ähnlich wie die anderen B7-Moleküle. PD-L2 wird als einziges der untersuchten B7-Moleküle auf CD11c^{hi}/CD8 α ⁺DZ stärker exprimiert, als auf CD11c^{hi}/CD8 α ⁻DZ. ICOS-L wird dagegen wie auch CD80, CD86 und PD-L1 auf den beiden CD11c^{hi}-exprimierenden Subpopulationen gleich stark exprimiert. Daher ist es unwahrscheinlich, dass ICOS-L zu den funktionellen Unterschieden dieser DZ-Subtypen beiträgt.

IV.2 Die ICOS/ICOS-L-Interaktion beeinflusst die Differenzierung von TZ

Aufgrund der Expression des ICOS-L auf murinen DZ wurde ein in vitro System zur Analyse der Funktion des ICOS/ICOS-L-Signalwegs bei der initialen Aktivierung naiver, antigenspezifischer CD4⁺-TZ durch murine DZ aus der Milz und bei der sekundären Immunantwort aufgebaut. Dafür wurden CD4⁺-TZ aus Do11.10 BALB/c-Mäusen verwendet, die für einen Ova-Peptid-spezifischen T-Zell Rezeptor (TZR) transgen sind. Die Verwendung der transgenen TZ eignet sich besonders gut für die Analyse der Differenzierung von CD4⁺-TZ: Die Mehrheit der TZ sind naiv und besitzen eine bekannte Antigen-spezifität. Daher können sie durch physiologische Signale stimuliert werden (Peptid und MHC-Komplex auf APZ). Der ICOS/ICOS-L-Signalweg wurde in der Kokultur aus DZ, TZ und Peptid während der primären Stimulation durch Blockade-Reagenzien unterbrochen. Zum Vergleich wurde in weiteren Ansätzen ebenfalls der B7/CD28/CTLA-4-Signalweg unterbrochen. Diese so aktivierten TZ wurden nach einer Ruhephase gewaschen und ohne Blockaden restimuliert. Die in den Kokulturen produzierten Zytokine wurden 2 Tage nach primärer Stimulation

bzw. 24 h nach Restimulation analysiert. Bei primärer Stimulation führte die Blockade der ICOS/ICOS-L-Interaktion zu einer erhöhten Produktion von IFN- γ und IL-10. Die Produktion von IL-2 und IL-4 wurde nicht beeinflusst. Bei Restimulation dieser TZ wurde abermals eine erhöhte Menge an IFN- γ sowie eine reduzierte Produktion von IL-4 in der Kokultur festgestellt. IL-10 blieb hier unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse wurden durch Experimente mit ICOS-defizienten Mäusen bestätigt. Das ist eine wichtige Kontrolle, da man bei der Verwendung von Blockadereagenzien eine Restaktivierung durch ungenügend abgeblockte Oberflächenmoleküle nicht ausschließen kann. Allerdings ist zu beachten, dass in diesen Ansätzen der ICOS/ICOS-L-Signalweg auch während der Restimulationsphase fehlte.

Beim Vergleich des Einflusses der ICOS/ICOS-L-Blockade auf die Zytokinproduktion mit dem der CD28/CTLA-4 Blockade wurde der exklusive Einfluss des CD28-Signalwegs auf die IL-2-Produktion bestätigt, der bereits in vielen Untersuchungen gezeigt wurde. (Hutloff *et al.*, 1999; Beier *et al.*, 2000; Riley *et al.*, 2001). Darauf zeigte die Blockade des ICOS/ICOS-L-Systems auch in unserem System keinerlei Auswirkungen. Weitere Zytokine, die ebenfalls unterschiedlich beeinflusst wurden, sind IFN- γ (erniedrigte Produktion bei CD28/CTLA-4-Blockade) und IL-10 (IL-10 allerdings nur bei Restimulation).

Mit IFN- γ und IL-10 wird während der primären Stimulation durch ICOS-Blockade sowohl ein wichtiges Th1-, als auch ein Th2-unterstützendes Zytokin erhöht. Bei Restimulation der TZ führte die Blockade des ICOS/ICOS-L-Signalwegs jedoch mit einer erhöhten IFN- γ und einer erniedrigten IL-4 - Produktion zu einer Th1-gerichteten Zytokinproduktion. Möglicherweise dominierten während der primären Stimulation unter ICOS-Blockade produzierte Th1-Zytokine (z.B. IFN- γ) die Differenzierung der TZ. Diese Beobachtung wird durch ähnliche Experimente anderer Gruppen bestätigt. In einem Ansatz, der sich nur durch die Verwendung einer Milz-Zellsuspension anstatt gereinigter DZ von unserem Ansatz unterschied, wurde bei Blockade des ICOS/ICOS-L-Signalwegs nach Restimulation der TZ ebenfalls eine

erhöhte Produktion von IFN- γ und eine erniedrigte Produktion von IL-4 festgestellt. Hinzu kam in diesem System noch eine erniedrigte Produktion von IL-10 (Mc. Adam *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmals gezeigt, dass die Expression des ICOS-L auf murinen DZ der Maus die Zytokinproduktion von TZ nach Aktivierung beeinflussen kann. Ferner legen die Resultate nahe, dass die ICOS/ICOS-L-Interaktion (zumindest in unserem System) für eine Th2-orientierte Differenzierung der TZ wichtig ist. Verschiedene Untersuchungen weisen ebenfalls wie die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass ICOS-vermittelte Kostimulation für die Entwicklung Th2-gerichteter Immunantworten wichtig ist: *In vitro* Studien haben gezeigt, dass Th2-Zellen größere Mengen an ICOS mRNA (Coyle *et al.*, 2000) und Protein exprimieren als Th1-Zellen (Coyle *et al.*, 2000; McAdam *et al.*, 2000; Gonzalo *et al.*, 2001). Auch einige Infektionsmodelle unterstützen diese Ergebnisse (Gonzalo *et al.*, 2001), wenn auch nicht ausschließlich (Tesciuba *et al.*, 2001). Die Blockade des ICOS-Signalwegs *in vivo* unterbindet Th-2-vermittelte Atemwegsentzündungen (Coyle *et al.*, 2000; Gonzalo *et al.*, 2001; Tesciuba *et al.*, 2001). In einem Modell Th1-vermittelter experimenteller autoimmuner Encephalomyelitis wurde nachgewiesen, dass ICOS-Defizienz zu einer Verschlechterung des Zustands führte (Dong *et al.*, 2001). Außerdem weisen ICOS-defiziente Mäuse einen Defekt der Produktion von IL-4 und IL-13, jedoch nicht von IFN- γ auf und produzieren verglichen mit WT-Tieren reduzierte Mengen Th2-abhängiger Antikörper der Isotypen IgG1 und IgE (Dong *et al.*, 2001, Mc Adam *et al.*, 2001; Tafuri *et al.*, 2001; Greenwald *et al.*, 2001).

Andererseits gibt es zahlreiche Untersuchungen, die auch für Th1-polarisierte Immunantworten eine Relevanz der ICOS-vermittelten Kostimulation von T-Zellen nachweisen: Frühe Analysen zeigten bereits, dass die Kostimulation von TZ durch ICOS nicht nur die Produktion von IL-10 und IL-4, sondern auch die von IFN- γ und TNF- α fördert (Hutloff *et al.*, 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass ICOS sowohl für die chronische, als auch die akute, Th1-abhängige Abstoßungsreaktion von Fremdgewebe nötig ist (Özkaynak *et al.*, 2001). Schließlich gibt es noch Hinweise für eine Rolle von ICOS für die Induktion

IL-10-produzierender regulatorischer TZ, die in einem Transfermodell Th2-polarisierte Immunantworten und akute Atemwegshyperreaktivität inhibieren können (Akbari *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen belegen, dass die Expression von ICOS auf der Zelloberfläche von Effektor-TZ nicht generell mit einem bestimmten Zytokinmuster der Zellen korreliert (Übersichtsartikel: Kroczyk *et al.*, 2004). Bei Infektion von Mäusen mit *Schistosoma Mansoni*, einem Th2-orientierten Infektionsmodell, korreliert die ICOS-Expression der Effektor-TZ in peripheren Organen z.B. mit der Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10. Bei Infektion mit *Toxoplasma Gondii* hingegen, einem Th1-orientierten Infektionsmodell, korreliert eine starke ICOS-Expression der TZ mit der Produktion des typischen Th1-Zytokins IFN- γ (Bonhagen *et al.*, 2003). Zusammengefasst korreliert die Expression von ICOS während der Effektor-Phase einer Immunantwort am besten mit der Produktion des jeweiligen Effektor-Zytokinprofils der untersuchten Modelle, welches vom Ort und von der Art einer Infektion abhängt. Anstatt die Produktion bestimmter Zytokine zu fördern, scheint die ICOS-Stimulation immer das jeweilige Gesamtpotenzial der Zellen abzurufen. Eine Ausnahme dazu bildet die Produktion von IL-10, die in der Mehrheit der Untersuchungen eng mit einer ICOS-Expression der TZ assoziiert ist (Hutloff *et al.*, 1999; Mc. Adam *et al.*, 2001; Löhning *et al.*, 2003, Bonhagen *et al.*, 2003; Witsch *et al.*, 2002). Die Produktion von IL-10 wurde in unserem Kokultursystem bei fehlender ICOS-Stimulation jedoch allenfalls erhöht, aber nie negativ beeinflusst. Das würde man aber erwarten, wenn die ICOS-Kostimulation der entscheidende Stimulus für die Produktion dieses Zytokins wäre. Damit widerspricht das Ergebnis dieser Arbeit den bisherigen Daten zur Abhängigkeit einer IL-10-Produktion von ICOS-Kostimulation. Allerdings gibt es weitere Hinweise darauf, dass ICOS für die IL-10-Produktion nicht unbedingt notwendig ist: Auch ICOS-defiziente Mäuse produzieren nach Stimulation des TZR durch einen monoklonalen Antikörper IL-10 (Dong *et al.*, 2001). Außerdem wurde in einem Colitis-Transfermodell mit SCID-Mäusen ebenfalls keine Korrelation zwischen IL-10-produzierenden und ICOS-exprimierenden TZ festgestellt (Bonhagen *et al.*, 2003).

Da die Kostimulation durch ICOS-L auf DZ bei initialer TZ-Aktivierung die TZ-Differenzierung *in vitro* beeinflusst, ist dies auch *in vivo* denkbar.

Da die Auswirkungen ICOS/ICOS-L-vermittelter Kostimulation jedoch von einer Vielzahl an Bedingungen *in vivo* abhängig sind, sollte die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Relevanz der ICOS/ICOS-L-Interaktion bei der initialen Aktivierung naiver, antigenspezifischer TZ durch DZ für die Entwicklung eines Th2- Zytokinprofils auch unter realistischen Bedingungen *in vivo* überprüft werden. *In vitro* werden z. B. die DZ spontan so stark aktiviert, dass eine große Menge an Oberflächenmolekülen, die an der Aktivierung von TZ beteiligt sind, massiv heraufreguliert werden (Abb. 3). *In vivo* wird die Aktivierung der DZ-Subtypen dagegen differenzierter reguliert, z.B. durch die Bindung von pathogenspezifischen Stimuli an Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*) wie *toll like receptors* (TLR, Überblicksartikel: Iwasaki, 2004). Das könnte auch zu einer sehr differenzierten Expression von ICOS-L im Kontext mit anderen stimulierenden Oberflächenmolekülen führen.

Da die Aktivierung der TZ von der Gesamtwirkung aller stimulierenden und inhibierenden Signale abhängt („multisignal integration“, Kroczeck *et al.*, 2004), könnte die Expression von ICOS-L auf DZ *in vivo* auch unterschiedliche Auswirkungen auf die TZ-Aktivierung haben, je nachdem, welche weiteren Faktoren auf die TZ einwirken und in welchen „Signal-Kontext“ die ICOS-Stimulation integriert ist.

IV.3 Die ICOS-L-Expression auf DZ wird durch Zytokine und pathogenspezifische Stimuli beeinflusst

Da die Interaktion des ICOS-L auf DZ mit ICOS auf TZ die Differenzierung von antigenspezifischen T-Zellen nach Aktivierung beeinflussen kann, ist die Regulation der Expression des Moleküls auf DZ möglicherweise ein wichtiger Faktor für die Ausrichtung einer Immunantwort. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die ICOS-L-Expression in murinen Fibroblasten (Swallow *et al.*, 1999), auf CD43⁺-hämatopoietischen Vorläufer-Zellen (Richter *et al.*, 2001) und auf Endothelzellen (Khayyamian *et al.*, 2002) durch TNF- α stimuliert werden kann. Weitere Zytokine, die die Expression des ICOS-L auf verschiedenen Zelltypen beeinflussen sind GM-CSF (Richter *et al.*, 2001) und IFN- γ (Swallow *et al.*, 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass die Gabe von LPS, einem

potenten Induktor von TNF- α *in vivo* die ICOS-L mRNA in verschiedenen peripheren Geweben induziert (Swallow *et al.*, 1999). LPS ist ein Ligand für TLR, die auf DZ exprimiert werden. Daher wurde der Einfluss von TNF- α und anderen inflammatorischen Stimuli, Zytokinen und TLR-Liganden (GM-CSF, IL-3, IL-10, IL-4, IFN- γ , IL-12, LPS und poly I:C) auf die ICOS-L-Expression primärer muriner DZ vergleichend mit der Expression anderer B7-Moleküle untersucht.

Die Reagenzien führten allenfalls zu einer Verzögerung der Heraufregulation des ICOS-L auf DZ in der Zellkultur, aber nie zu einer über die spontane Aktivierung der Zellen hinausgehende Steigerung der Expressionsstärke. Auf die Expression der anderen untersuchten Oberflächenmoleküle wurde teilweise eine stimulatorische Wirkung der Reagenzien beobachtet, besonders auf PD-L2, das durch alle untersuchten Reagenzien heraufreguliert wurde. Die Expression des ICOS-L auf der Zelloberfläche wurde durch GM-CSF und IFN- γ auf allen DZ inhibiert, und selektiv durch LPS bzw. pl:C auf CD8 α^+ -DZ inhibiert. TNF- α zeigte keine Wirkung auf die ICOS-L-Expression. Die Inhibition der ICOS-L-expression auf DZ durch IFN- γ ist besonders interessant, da die ICOS/ICOS-L-Interaktion bei der Aktivierung von antigenspezifischen TZ durch DZ die Produktion dieses Zytokins inhibiert (Kap. III.2). An diesem Punkt könnten Rückkopplungsprozesse ansetzen.

Mit diesen Eigenschaften unterscheidet sich die Regulation der ICOS-L-Expression auf der Oberfläche von DZ von der auf anderen Zelltypen. Allerdings beschränken sich die Beschreibungen der stimulierenden Wirkung von Reagenzien auf die ICOS-L-Expression ausschließlich auf periphere Organe/Gewebe. In lymphoiden Organen, wie der Milz, könnte die ICOS-L-Expression anders reguliert sein. Swallow *et al.* haben beispielsweise gezeigt, dass die Gabe von LPS *in vivo* die Expression der mRNA des ICOS-L in peripheren Organen zwar fördert aber auf die Expression des ICOS-L in der Milz kaum Auswirkungen hat (Swallow *et al.*, 1999). Das ist beachtlich, da es in der Milz viele Zellpopulationen gibt, die ICOS-L exprimieren können. Untersuchungen von primären, CD11c $^+$ DZ aus Lymphknoten der Maus haben gezeigt, dass die DZ bei Immunisierung *in vivo* aktiviert werden und ICOS-L

ebenso wie andere B7-Moleküle dabei heraufregulieren (Akbari *et al.*, 2002). Die DZ-Subpopulationen in Milz und Lymphknoten sind sehr ähnlich. Das weist darauf hin, dass es auch abgesehen von der spontanen Heraufregulation von ICOS-L auf DZ *in vitro* Faktoren gibt, die die Expression von ICOS-L *in vivo* stimulieren. Möglicherweise wurde die Expression des ICOS-L auf den DZ *in vitro* spontan bereits maximal stimuliert, so dass ein fördernder Effekt der untersuchten Reagenzien keine zusätzliche Expressionssteigerung mehr bewirkte. Da in dieser Arbeit keine Bedingungen gefunden werden konnten, die die spontane Aktivierung der DZ *in vitro* verhindern ohne ihre Viabilität zu beeinträchtigen (Daten nicht gezeigt), sollten weiter Untersuchungen *in vivo* erfolgen. Mit GM-CSF, IFN- γ , IL-4 und LPS wurden mehrere Faktoren identifiziert, die die ICOS-L-Heraufregulation auf DZ aus der Milz *in vitro* inhibieren können. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dieser Befund *in vivo* bestätigt werden kann.

IV.4 der virale Fc γ -R m138/fcr-1 moduliert die ICOS-L-Expression auf MCMV-infizierten Zellen

Die direkte Infektion der DZ mit dem murinen Zytomegalovirus (MCMV) führte zu einer deutlichen und effektiven Herunterregulation des ICOS-L von der Zelloberfläche. Die Analyse von DZ nach Infektion mit einem MCM-Virus, das unter der Kontrolle eines viralen Promotors für früh exprimierte Gene ("immediate early promotor") grün-fluoreszierendes Protein exprimiert (MCMV-GFP) zeigte, dass dieser Effekt eine Infektion der Zellen voraussetzt und kein, z.B. durch einen löslichen Faktor vermittelter Sekundäreffekt ist: Nur jene DZ, in denen GFP detektierbar war regulierten ICOS-L herunter (Daten nicht gezeigt). Das gilt auch für infizierte ICOS-L-exprimierende NIH 3T3-Transfektanten (Abb. 13). In der vorliegenden Arbeit wurde das für diesen Phänotyp verantwortliche Protein durch die systematische Analyse von MCMV-Mutanten erstmals identifiziert. Dabei handelt es sich um den viralen Fc- γ -Rezeptor m138/fcr-1.

Mehrere experimentelle Daten unterstützen diese Aussage:

1. Ein MCM-Virus mit einer Mutation im m138/fcr-1-Gen, die ausschließlich die Expression des m138-Gens unterbricht, verliert die Fähigkeit zur Inhibition der ICOS-L-Expression auf infizierten Zellen.

2. Die Wiederherstellung des Gens im mutierten Virus stellt auch seine ursprüngliche Fähigkeit zur Herunterregulation des ICOS-L wieder her.
3. Die gleichzeitige Ko-Transfektion von ICOS-L und m138/fcr-1 resultierte in einer deutlichen Herunterregulation des ICOS-L von der Zelloberfläche verglichen mit der Ko-Transfektion von ICOS-L und einem Kontrollprotein.

Zelluläre Fc- γ -Rezeptoren (cFc γ R) spielen als Bindeglieder zwischen antikörpervermittelten Immunantworten und zellulärer Immunität eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen (Übersichtsartikel: Ravetch *et al.*, 2001). Durch die Bindung des Fc-Teils von Antikörpern gewährleisten diese Rezeptoren die Antigenpezifität von Effektor-Zellen wie NK-Zellen oder Makrophagen, die normalerweise über keine eigenen Rezeptoren für variable Antigene verfügen. Die Aktivierung von Fc γ R durch Immunkomplexe löst gezielte Immunantworten dieser Zellen, wie die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren oder antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität („antibody-dependent cellular cytotoxicity“, ADCC), aus. Seit mehr als 25 Jahren ist bekannt, dass Mitglieder der α und β Unterfamilie der Herpesviren (herpesviridae) wie HSV Typ 1 und 2, Varicella-Zoster-Virus sowie murines und humanes Zytomegalovirus über Gene für Oberflächenproteine verfügen, die Fc-Teile von IgG-Immunglobulinen binden können (Budt *et al.*, 2004). Die biologische Funktion dieser viralen Fc γ R ist allerdings noch weitestgehend unbekannt. Es wird z.B. ein Modell der bipolaren Brückenbildung von Antikörpern („antibody bipolar bridging“) diskutiert, welches die gleichzeitige Bindung und damit Inaktivierung eines Antikörpers an ein Antigen durch die hypervariable Region und an einen viralen Fc γ R durch seinen Fc-Teil postuliert (Frank *et al.*, 1989). Der Fc-Teil könnte dadurch gegenüber den Rezeptoren des Immunsystems z.B. auf NK-Zellen oder Komplement-Faktoren kompetitiv blockiert werden. Bei dem von MCMV exprimierten Fc γ R m138/fcr-1 handelt es sich um ein aus 569 Aminosäuren aufgebautes, glykosyliertes Transmembranprotein des Typs 1, das an den Fc-Teil von murinem IgG binden kann (Thäle *et al.*, 1994). Es wird extrazellulär, aber hauptsächlich intrazellulär exprimiert (Lenac *et al.*, 2006). *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass eine Virusmutante mit einer Deletion des m138/fcr-1-Gens während der primären

Infektion stark attenuiert ist, allerdings auch in Abwesenheit von Antikörpern. Das ist ein Hinweis darauf, dass es möglicherweise weitere IgG-unabhängige Funktionen von m138/fcr-1 gibt. Mit der Identifikation des m138/fcr-1 als Faktor zur Herunterregulation des ICOS-L von infizierten Zellen wurde damit eine weitere Funktion des Moleküls als potenzielles „Immunevasin“ identifiziert. Kürzlich wurde gezeigt, dass m138/fcr-1 zudem noch weitere Oberflächenmoleküle von infizierten Zellen herunterreguliert. Dazu gehören die Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D, MULT-1 und H60 (Lenac *et al.*, 2006). Es gibt noch weitere virale Proteine des MCMV, die mehrere Funktionen haben, z. B. m152: Einerseits verhindert es den Transport von MHC-I an die Zelloberfläche und andererseits verhindert es die Expression des NKZ-Rezeptors RAE-1. Möglicherweise kommen diese Mehrfachfunktionen viraler Proteine durch den Selektionsdruck zustande, möglichst viele Funktionen in einem begrenzten Genom unterzubringen.

Trotz der Fähigkeit zur Herunterregulation mehrerer verschiedener Immunrezeptoren von der Plasmamembran ist m138/fcr-1 dennoch in einem bestimmten Rahmen selektiv, denn andere NKG2D-Liganden oder MHC-I-Moleküle werden durch m138/fcr-1 nicht beeinflusst (Lenac *et al.*, 2006). MCMV zeigt auch in Bezug auf die Gruppe der B7-Moleküle eine gewisse Selektivität, denn obwohl neben ICOS-L noch CD80, CD86 und PD-L2 von der Oberfläche infizierter DZ herunterreguliert werden, wird PD-L1 nicht beeinflusst. Da es Hinweise auf eine negativ stimulatorische Funktion von PD-L1 in Verbindung mit seinem Liganden PD-1 gibt (Freeman *et al.*, 2000), könnte sich die uneingeschränkte Expression von PD-L1 positiv auf die Vermehrung des MCMV auswirken. Die Analyse des genauen Mechanismus der m138/fcr-1-vermittelten Herunterregulation von ICOS-L kann weitere Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der Expression von B7-Molekülen liefern. M138/fcr-1 setzt sich zusammen aus 3 Fc γ R-verwandten Domänen der Ig-Superfamilie Ig1, Ig2 und Ig3, die eine signifikante Sequenzhomologie mit den Ig-Domänen der zellulären Fc γ R CD16/ Fc γ RIII und CD32/Fc γ RIII besitzen, und aus einer N-glycan-reichen Domäne (Lenac *et al.*, 2006; Budt *et al.*, 2004). Dieser modulare Aufbau könnte eine Ursache für die zahlreichen Funktionen von

m138/fcr-1 sein. Untersuchungen mit Domänen-Deletionsmutanten des Moleküls haben ergeben, dass für die Herunterregulation von MULT-1 die Ig1-Domäne alleine in membranständiger Form ausreicht. Für die Modulation der H60-Expression wird demgegenüber die gesamte extrazelluläre Domäne in membranständiger Form benötigt (Lenac *et al.*, 2006). Für die Herunterregulation von ICOS-L auf infizierten Zellen sind alle 3 Ig-Domänen notwendig (M. Budt und M. Ganser, unveröffentlicht). Damit könnte der Regulation des ICOS-L und der von H60 ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass m138 und ICOS-L in infizierten Zellen intrazellulär in einem kernnahen Kompartiment kolokalisiert sind. Das ist ein möglicher Hinweis auf den Mechanismus der Herunterregulation von ICOS-L von der Zelloberfläche: Neben der Möglichkeit zur Interaktion auf der Zelloberfläche können beide Moleküle auch intrazellulär interagieren. Für MULT-1, aber nicht H60 wurde z.B. eine Degradierung des Moleküls in Lysosomen nachgewiesen (Lenac *et al.*, 2006). Es gibt also mindestens zwei verschiedene Mechanismen, mit denen m138/fcr-1 Oberflächenmoleküle moduliert.

IV.5 ICOS ist wichtig für die Bekämpfung einer MCMV-Infektion

Zur Analyse der Relevanz der ICOS/ICOS-L-Interaktion bei der Immunantwort gegen MCMV wurde die Entwicklung der Virustiter infizierter, ICOS-defizienter Mäuse mit der von WT-Tieren *in vivo* verglichen. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Elimination des Virus aus befallenen Organen bei ICOS-Defizienz deutlich verzögert ist. Es gibt Hinweise für die Expression von ICOS nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf NK-Zellen (Ogasawara *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Totsuka *et al.*, 2003). NK-Zellen sind insbesondere in der frühen Phase einer MCMV-Infektion (Tag 7 – Tag 9) wichtig für die Bekämpfung der Virusvermehrung in Milz, Lunge und Leber (Bukowski *et al.*, 1983). Allerdings zeigte sich der Unterschied im Virustiter in unserem System erst zu späteren Zeitpunkten der Infektion (Tag 15 in der Milz, Tag 29 in der Speicheldrüse). Das deutet darauf hin, dass es sich möglicherweise nicht um einen Effekt handelt, der durch NK-Zellen vermittelt wird. Außerdem konnte die Expression von ICOS auf NK-Zellen in unserem Labor nicht bestätigt werden. Im Laufe der MCMV-Infektion sind erst ab dem 8. Tag nach Infektion stark ICOS-exprimierende

T-Zellen in Milzen und Speicheldrüsen infizierter Tiere nachweisbar. Bisherige Untersuchungen zur Bedeutung von TZ für die Bekämpfung einer MCMV-Infektion haben gezeigt, dass sowohl CD8⁺-, als auch CD4⁺-TZ für die Eliminierung von MCMV wichtig sind, allerdings scheinen CD8⁺-TZ dafür bedeutender zu sein. CD4⁺-TZ sind jedoch z. B. für die Elimination des Virus aus der Speicheldrüse infizierter Tiere essenziell (Übersichtsartikel: Krmpotic *et al.*, 2003). ICOS wird bei MCMV-Infektion sowohl auf CD8⁺-, aber noch stärker auf CD4⁺-TZ exprimiert. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion des ICOS-L auf infizierten Zellen mit ICOS auf den infiltrierenden, aktivierten T-Zellen für die Elimination des MCMV zu späteren Zeitpunkten wichtig ist.

Die ICOS/ICOS-L-Interaktion spielt auch bei der Infektabwehr gegen andere Viren eine Rolle: Eine detaillierte Studie von ICOS-defizienten Patienten hat beispielsweise gezeigt, dass einige der Patienten an wiederkehrenden Infektionen mit Herpes-Simplex-Virus und Papillomaviren litten (Grimbacher *et al.*, 2003). Studien ICOS-defizienter Mäuse haben gezeigt, dass die ICOS/ICOS-L Interaktion insbesondere für die antikörpervermittelte Immunantwort gegen Viren wie Lymphozytären-Choriomeningitis-Viren (LCMV), Vesicular-Stomatitis-Viren (VSV) und Influenza-Viren wichtig ist (Bertram *et al.*, 2002; Vidric *et al.*, 2005).

Für die Bekämpfung einer MCMV-Infektion spielen Antikörper allerdings bei der Bekämpfung der primären Infektion nur eine untergeordnete Rolle, wie Studien mit B-Zell-defizienten Mäusen belegen. Nur im Fall einer Virus-Reaktivierung nach einer Phase der Latenz wirkt sich das Fehlen von B-Zellen in Form eines schneller ansteigenden Virustiters aus. Daher ist es unwahrscheinlich, dass der Beitrag von ICOS auf aktivierten T-Zellen, der zu einer Reduzierung des viralen Titers während der akuten Phase der Infektion beiträgt, in der Stimulation von B-Zell-vermittelten Immunantworten liegt. Eine genaue Untersuchung der Antikörperproduktion ICOS-defizienter Mäuse bei MCMV-Infektion im Vergleich mit WT-Tieren würde darüber weitere Erkenntnisse liefern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ICOS/ICOS-L-Interaktion nachweislich ein entscheidender Faktor zur raschen Elimination von produktivem Virus aus infizierten Organen ist. Die Modulation des ICOS-L auf infizierten Zellen stellt möglicherweise eine virale Strategie zur Kontrolle der T-Zell-vermittelten Immunantwort dar. Mit fcr-1/m138 wurde das für diese Modulation verantwortliche virale Protein identifiziert. Dabei handelt es sich um einen multifunktionalen Modulator von MCMV-spezifischen angeborenen und adaptiven Immunantworten, dem in dieser Arbeit eine weitere Funktion zugeordnet werden konnte.