

Aus dem Fachgebiet
Molekulare Immunologie
des Robert Koch-Instituts
Berlin

DISSERTATION

**Vergleich der Funktion von ICOS/ICOS-L und CD28/CD80-CD86 in der
Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen**

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie/Chemie/Pharmazie
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Esther Julia Witsch
aus Freiburg

Berlin 2002

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. K. Seppelt

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. A. Kroczek
2. Prof. Dr. rer. nat. Th. Blankenstein
3. Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Pflüger

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Derzeitiges Modell der T-Zell-Aktivierung	1
1.2 Regulation von Immunantworten durch Th1- versus Th2-Zell Subpopulationen	4
1.3 Modulation der Immunantwort durch Subpopulationen von dendritischen Zellen	4
1.3.1 Polarisierung von Th1- und Th2-Zellen durch dendritische Zellen	4
1.3.2 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch dendritische Zellen	5
1.4 Kostimulatorische Moleküle auf T-Zellen: CD28 und CTLA-4	6
1.5 Liganden für CD28 und CTLA-4: CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen	7
1.6 Neue Mitglieder der B7-Familie und der CD28-Familie	8
1.6.1 ICOS	8
1.6.2 ICOS-L	9
1.7 Modulation der Immunantwort durch kostimulatorische Moleküle	11
1.8 Aufgabenstellung	12
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Laboreigene Fusionsproteine und Antikörper	14
2.1.1 Generierung von löslichen ICOS-Fusionsproteinen	15
2.1.2 Generierung von ICOS-L spezifischen monoklonalen Antikörpern	15
2.2 Zellbiologische Methoden	16
2.2.1 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation	16
2.2.1.1 Gewinnung von hitzeinaktiviertem humanen Plasma	16
2.2.2 Gewinnung mononukleärer Zellen aus der Tonsille durch Dichtegradientenzentrifugation	17
2.2.3 Aufreinigung von Zellen durch MACS (<u>M</u> agnetic <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> ort)	17
2.2.4 Magnetische Sortierung von T-Zellen	18
2.2.5 Präparation einer epidermalen Zell-Suspension und magnetische Isolierung von Langerhans-Zellen	20
2.2.6 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten	20
2.2.7 Kokulturen von T-Zellen mit dendritischen Zellen	22

2.2.8 Generierung von ICOS, ICOS-L und CD40L Transfektanten	23
2.2.9 Stimulation von dendritischen Zellen mit Zelllinien	24
2.2.10 Stimulation von Zellen durch immobilisierte Antikörper	25
2.3 Durchflußzytometrie	26
2.3.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen von Kokulturen	28
2.3.2 Kalte Blockade	28
2.3.3 Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper	29
2.4 Bestimmung von Zytokinen durch ELISA	30
2.5 Histologie	32
2.6 RNA Isolation und Northern Analyse	32
3 ERGEBNISSE	34
3.1 Expression von ICOS-L und anderen Oberflächenantigenen auf Monozyten-generierten dendritischen Zellen	34
3.1.1 Sensitivität der Reagenzien zur Detektion von ICOS-L und Blockadefähigkeit eines monoklonalen Antikörpers gegen ICOS-L	34
3.1.2 Etablierung der Kultur von aus Monozyten generierten dendritischen Zellen	36
3.1.3 Monozyten und dendritische Zellen exprimieren ICOS-L	37
3.1.4 Ex vivo isolierte Langerhans-Zellen exprimieren ICOS-L vergleichbar zu in vitro generierten dendritischen Zellen	38
3.1.5 In vivo wird ICOS-L von Langerhans-Zellen humaner Haut exprimiert	40
3.1.6 ICOS-L mRNA wird in unreifen und in reifen dendritischen Zellen transkribiert	41
3.1.7 Phänotypische Charakterisierung von unreifen und reifen dendritischen Zellen	42
3.1.8 Reifung dendritischer Zellen führt zu reverser Regulation von CD80/CD86 und ICOS-L	43
3.1.9 Stimulation über ICOS-L durch eine ICOS-Transfektante führt nicht zu Reifung von dendritischen Zellen	46
3.2 Regulation von ICOS und ICOS-L in der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen	47
3.2.1 ICOS wird auf CD4 ⁺ und auf "naiven" CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T-Zellen in der Interaktion mit reifen dendritischen Zellen stark heraufreguliert	47
3.2.2 ICOS-L wird auf dendritischen Zellen in Kokultur mit CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T-Zellen herunterreguliert	51
3.2.3 ICOS-L wird durch die direkte Interaktion mit ICOS herunterreguliert	53

3.2.4 “Naive” T-Zellen verändern ihren Phänotyp durch die primäre Stimulation und werden zu Gedächtnis/Effektor-T-Zellen	53
3.2.5 In einer sekundären Stimulation von T-Zellen wird ICOS erneut heraufreguliert	54
3.2.6 Durch die Blockade von CD28/CD80-CD86 in primären und sekundären Kokulturen wird die Expression von ICOS inhibiert	56
3.3 Funktioneller Vergleich der ICOS/ICOS-L und CD28/CD80-CD86 Signalwege in der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen	58
3.3.1 Blockade von CD28/CD80-CD86 führt im Vergleich zur Blockade von ICOS/ICOS-L in der Primärkultur von CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T-Zellen mit dendritischen Zellen zu stark verminderter Zytokinsekretion	58
3.3.2 Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Sekundärstimulation inhibiert selektiv IL-10, Blockade des CD28/CD80-CD86 Signalwegs führt dagegen zu einer starken Erhöhung von IL-10 und einer Verminderung von IL-2, IL-6, IL-13 und IFN- γ	59
3.3.3 Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Primärstimulation von Gedächtnis-T-Zellen aus der Tonsille inhibiert selektiv IL-10, während Blockade des CD28/CD80-CD86 Signalwegs IL-10 nicht beeinflußt und IL-2, IL-13 und IFN- γ hemmt	61
3.4 "Naive" und "Gedächtnis"-T-Zellen des peripheren Bluts unterscheiden sich in ihrem Zytokinprofil nach CD28-Kostimulation im Vergleich zu ICOS-Kostimulation	63
4 DISKUSSION	65
Expression von ICOS-L auf dendritischen Zellen	65
Zytokine in primären T-Zell-Antworten nach Stimulation mit dendritischen Zellen	67
Zytokine in sekundären T-Zell-Antworten nach Stimulation mit dendritischen Zellen	69
Einfluß von ICOS/ICOS-L auf die T-Zell-Proliferation	73
Induktion von Th1 oder Th2 durch den Einfluß von ICOS/ICOS-L	73
Mögliche klinische Relevanz	75
5 ZUSAMMENFASSUNG	76
5 SUMMARY	77

6 REFERENZEN	78
---------------------	-----------

7 ANHANG	87
-----------------	-----------

Veröffentlichungen	87
---------------------------	-----------

Lebenslauf	88
-------------------	-----------

Danksagung	89
-------------------	-----------

Eidesstattliche Erklärung	90
----------------------------------	-----------

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1	Dendritische Zellen im Immunsystem.	3
Abb. 2	Reife dendritische Zellen initiieren und unterhalten die Immunantwort durch Stimulation von CD4 ⁺ T-Zellen.	10
Abb. 3	Charakterisierung von ICOS-L spezifischen mAk.	35
Abb. 4	Monozyten-generierte dendritische Zellen zeigen eine charakteristische Morphologie mit einem reifen und einem unreifen Stadium.	36
Abb. 5	Oberflächenexpression von ICOS-L auf Monozyten und unreifen dendritischen Zellen.	37
Abb. 6	<i>Ex vivo</i> isolierte humane epidermale Langerhans-Zellen sind phänotypisch vergleichbar mit Monozyten-generierten unreifen dendritischen Zellen.	39
Abb. 7	In der Histologie der Haut ist ICOS-L auf Langerhans-Zellen exprimiert.	40
Abb. 8	Expression von ICOS-L mRNA.	41
Abb. 9	Phänotypische Charakterisierung von Monozyten-generierten dendritischen Zellen vor und nach Reifung mit einer Zytokin-Kombination.	43
Abb. 10	Reverse Regulation von CD80/CD86 und ICOS-L nach Stimulierung von dendritischen Zellen mit verschiedenen Stimulantien.	45
Abb. 11	Bindung von ICOS-L mit ICOS führt nicht zu einer Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen.	46
Abb. 12	CD4 ⁺ T-Zellen regulieren ICOS in Kokultur mit reifen dendritische Zellen herauf.	48
Abb. 13	“Naive” CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T-Zellen regulieren ICOS in der Kokultur mit reifen dendritischen Zellen herauf und werden aktiviert.	50
Abb. 14	Reife dendritische Zellen zeigen in Kokultur mit “naiven” CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T-Zellen und Superantigen eine Herunterregulation von ICOS-L.	51
Abb. 15	Kokultur von reifen dendritischen Zellen mit ICOS transfizierten L-Zellen führt zu einer Herunterregulation von ICOS-L.	53
Abb. 16	Naive T-Zellen exprimieren CD45RA und nach Stimulation die Isoform CD45R0.	54
Abb. 17	T-Zellen erfahren eine erneute Zunahme der ICOS Expression in der Restimulation.	55
Abb. 18	Die Expression von ICOS auf T-Zellen wird durch verschiedene Blockadesituationen in einer Kokultur von T-Zellen mit reifen dendritischen Zellen beeinflusst.	57
Abb. 19	Blockade des CD28 Signalwegs in einer primären Kokultur von T-Zellen mit dendritischen Zellen führt zu einer effektiven Blockade der Zytokinsekretion.	59
Abb. 20	Spezifische Inhibition von IL-10 durch Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in einer sekundären Kokultur von T-Zellen mit dendritischen Zellen.	61
Abb. 21	Inhibition von IL-10 durch Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in einer primären Kokultur von tonsillären Gedächtnis-T-Zellen mit dendritischen Zellen.	62
Abb. 22	“Naive” und Gedächtnis/Effektor-T-Zellen des peripheren Bluts unterscheiden sich in ihrem Zytokinprofil nach Kostimulation durch mAk gegen CD28 und ICOS.	64
Abb. 23	Mögliche zeitliche Rolle von CD80-CD86 und ICOS-L während einer Immunantwort.	70

Abkürzungen

(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
3HT	Tritium
BC	<i>B Cell</i> , B-Zelle
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4</i>
Cy5	Cyanin 5
DC	<i>Dendritic Cell(s)</i> , dendritische Zelle
DC _{prec}	<i>DC precursor</i>
DC _{prog}	<i>DC progenitor</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetra-acetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fötales Kälberserum
FDC	follikulär dendritische Zelle
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fl	Fluoreszenz
Glyc	Glycophorin
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
h	Stunde(n)
HEV	<i>High Endothelial Venule</i> , hohe endotheliale Venen
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPC	<i>Hematopoetic Pluripotent Cell</i> , hematopoetische Stammzelle
hu	human
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
LC	Langerhans-Zelle
LC _{ICOS}	ICOS-transfizierte L-Zellen
LC _{wt}	Wildtyp-L-Zellen
LPS	Lipopoyasaccharid
LS-Säulen	<i>Large Sort-Säulen</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sort</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistant Protein</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> , mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
mu	murin, Maus
ng	Nanogramm
NTC	<i>Nylon T Cells</i> , Nylonwolle-gereinigte T-Zellen
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDC	<i>Plasmacytoid Dendritic Cell(s)</i> , plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin E

PI	Propidiumiodid
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
POD	Peroxidase
Poly I:C	<i>Polyriboinosinic Polyribocytidylic Acid</i>
rDC	reife dendritische Zelle
RNA	<i>Ribo Nucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEA/SEB	Staphylokokkus Enterotoxin A bzw. B
SLC	<i>Secondary Lymphoid tissue Chemokine</i>
TC _{act}	aktivierte T-Zelle
TC _{naiv}	naive T-Zelle
TC	<i>T Cell(s)</i> , T-Zelle(n)
TH1	T-Helfer-Zelle Typ 1
TH2	T-Helfer-Zelle Typ 2
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
uDC	unreife dendritische Zelle
WT	Wildtyp

7 ANHANG

Veröffentlichungen

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen und Kongreßbeiträge hervorgegangen:

Witsch, EJ., Peiser, M., Hutloff, A., Büchner, K., Dorner, BG., Jonuleit, H., Mages, HW. and Kroczeck, RA., ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2002. in press.

Witsch, E., Mages, HW., Hutloff, A., Jonuleit, H., Kroczeck, RA., ICOS-Ligand and CD80/CD86 on dendritic cells induce differential cytokine secretion profiles in CD4⁺ T cells. *Immunobiol.* 2001. **204**: 144. (Abstract und Vortrag zur Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Dresden)

Hutloff, A., Mages, HW., Witsch, E., Heuck, C., Kroczeck, RA., Identification of the ICOS-ligand and analysis of the interdependence of the CD28 and ICOS pathways. *Immunobiol.* 2000. **203**: 72 (Abstract und Poster zur Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Düsseldorf)

Danksagung

Herrn Prof. R. A. Kroczeck danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen strategischen Besprechungen.

Für die hervorragende Betreuung in theoretischen und labortechnischen Angelegenheiten bedanke ich mich bei Herrn Dr. H. W. Mages.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Hutloff für die stete Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit bei allen Fragen zu meiner Arbeit. Yvonne Strübing und Katja Ranke waren mir eine zuverlässige technische Unterstützung im Labor. Elke Bleifuß war eine große Hilfe.

Bei Herrn Prof. Th. Blankenstein möchte ich mich für die offizielle Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich bedanken.

Mein Dank geht an Herrn Dr. H. Jonuleit in Mainz, in dessen Labor ich die Kultivierung dendritischer Zellen erlernen konnte.

Eidesstattliche Erklärung

Berlin, den 28. August 2002

Hiermit erkläre ich, Esther Witsch, an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Vergleich der Funktion von ICOS/ICOS-L und CD28/CD80-CD86 in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen" von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Esther Witsch