

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ICOS-L im Vergleich zu CD80-CD86 auf dendritischen Zellen ausführlich untersucht und gezeigt, daß sich ICOS/ICOS-L und CD28/CD80-CD86 in ihrer Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen während einer Immunantwort unterscheiden.

### Expression von ICOS-L auf dendritischen Zellen

Während der *in vitro* Differenzierung von dendritischen Zellen aus Monozyten wurde die Expression von ICOS-L induziert. Monozyten zeigten eine schwache Expression von ICOS-L, die nach Differenzierung zu dendritischen Zellen verstärkt wurde (Abb. 5). Während der *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten veränderte sich die Expressionsstärke nicht mehr im Gegensatz zur Herunterregulation des Monozytenmarkers CD14. Die Expression von CD80 und CD86 auf Monozyten war vergleichbar mit dem Expressionsniveau auf unreifen Monozyten-generierten dendritischen Zellen (Daten nicht gezeigt). Die vergleichbare Expression von ICOS-L und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf *ex vivo* isolierten Langerhans-Zellen (Abb. 6) und die Detektion von ICOS-L in der Histologie der Haut (Abb. 7) zeigen die Ähnlichkeit von unreifen Monozyten-generierten dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen und stützen die Relevanz der *in vitro* gewonnenen Daten mit Monozyten-generierten dendritischen Zellen.

Die Regulation von ICOS-L auf dendritischen Zellen unterscheidet sich bezüglich der Expression und Funktion grundlegend von den strukturverwandten Molekülen B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Interessanterweise führte Aktivierung und Ausreifen von dendritischen Zellen mit verschiedenen Stimulantien zu einer reversen Regulation der CD80/CD86 und der ICOS-L Expression. Es wurde eine leichte Abnahme der ICOS-L Expression beobachtet, während CD80 und CD86 durch alle getesteten Stimulantien eine starke Zunahme erfuhren. Stimulation mit Choleratoxin und IFN- $\gamma$  führte zwar zu einer Herunterregulation von ICOS-L, die Expression von CD80 und CD86 blieb jedoch gleich (Abb. 10), wie auch in Ref. [89] gezeigt.

Die Expression von ICOS-L und CD80/CD86 auf humanen Monozyten und Monozyten-generierten dendritischen Zellen wurde zeitgleich mit dieser Arbeit in einem anderen Labor untersucht. Monozyten zeigten nur eine sehr schwache Expression von ICOS-L, die nach Integrin-

vermittelter Adhärenz auf Plastik zunahm. ICOS-L zeigte durch Ausreifen mit verschiedenen Stimulantien wie LPS, TNF- $\alpha$  oder CD40-Stimulation keine Veränderung, während die Expression von CD80 und CD86 auch hier zunahm [54].

Gemessen an der CD83 Expression führten einige der getesteten Stimulantien zu einer vollständigen Reifung der dendritischen Zellen wie schon in anderen Arbeiten beschrieben [87;88;95;96].

Die reverse Regulation von CD80 und CD86 versus ICOS-L weist auf einen zeitlichen Aspekt in der biologischen Bedeutung dieser Moleküle hin. So nimmt während der Reifung von Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, die im Laufe einer Immunantwort an der ersten Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind, die Expression von CD80 und CD86 zu. Das kostimulatorische Partner-Molekül CD28 ist auf T-Zellen bereits beim ersten Kontakt mit solchen reifen dendritischen Zellen auf der Oberfläche exprimiert. Dies zeigt die frühe Bedeutung von CD80 und CD86 in der Interaktion mit CD28 in der T-Zell-Zone der sekundär-lymphatischen Organe, wo die T-Zellen aus dem Blutstrom auf dendritische Zellen aus den afferenten Lymphbahnen treffen [7] (s. Abb. 1).

CD80 und CD86 sind stark auf dendritischen Zellen exprimiert stehen als kostimulatorische Liganden zur Verfügung, während ICOS-L bei der initialen Aktivierung der T-Zellen eine untergeordnete Aufgabe übernimmt. Zwar wird ICOS-L auf unreifen dendritischen Zellen exprimiert, und nimmt durch Reifung und Aktivierung mit verschiedenen Stimulantien sogar leicht ab (Abb. 10), jedoch steht das Partner-Molekül ICOS auf T-Zellen vor Antigenkontakt nicht für eine Interaktion zur Verfügung. Möglicherweise nimmt die Expression von ICOS-L auf dendritischen Zellen zu einem späteren Zeitpunkt der Immunreaktion wieder zu, beispielsweise im Keimzentrum. So könnten dendritische Zellen im Keimzentrum einen Stimulus erhalten, der Einfluß auf die Regulation von ICOS-L auf gereiften dendritischen Zellen zu einem späteren Zeitpunkt hat, z. B. über CD40. Es wurde gezeigt, daß CD40-Stimulation in der Maus die IL-4 induzierte Herunterregulation von ICOS-L auf transgenen B-Zellen verhindert. IL-4 stellt für B-Zellen einen Reifungsstimulus dar [97].

Analysen von ICOS-L und ICOS in Kokulturen von dendritischen Zellen mit T-Zellen zeigten eine leichte Herunterregulation von ICOS-L auf dendritischen Zellen zeitgleich mit zunehmender ICOS Expression auf Seite der T-Zellen. Für diese Abnahme gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits könnte ICOS-L auf dendritischen Zellen in der Interaktion mit T-Zellen durch eine lösliche Form des ICOS-Proteins besetzt werden, so daß es sich in diesem Fall um eine "Maskierung" und nicht um eine Abnahme der Expression des Oberflächenmoleküls

handelte (Abb. 14). Der monoklonale Antikörper erkennt dasselbe Epitop wie das ICOS-Fusionsprotein (Abb. 3), so daß diese Situation also mit einem löslichen ICOS-Protein auch in Kokulturen von T-Zellen mit dendritischen Zellen auftreten könnte. In diesem Fall wäre eine Färbung von ICOS-L mit dem monoklonalen Antikörper nicht mehr möglich. Andererseits könnte ein von der T-Zelle ausgehendes Signal zu einer Internalisierung durch Endozytose von ICOS-L durch die dendritische Zelle führen, ähnlich wie dies z. B. für CD40L auf T-Zellen in der Interaktion mit CD40 auf dendritischen Zellen bekannt ist. Außerdem könnte auch die T-Zelle in der Interaktion mit dendritischen Zellen ein Signal zum Abschneiden von ICOS-L durch extrazelluläre Proteasen liefern [98;99].

Es ist wahrscheinlich, daß einer der Mechanismen in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen zu einer funktionellen Begrenzung der ICOS/ICOS-L Interaktion führt. Vorstellbar ist, daß die Interaktionsmöglichkeit von ICOS/ICOS-L auf ein enges Zeitfenster begrenzt ist, ähnlich wie für die Interaktion von CTLA-4 mit seinen Partnern CD80 und CD86 beschrieben [100-102]. Ein entscheidender Unterschied besteht jedoch zwischen CTLA-4 und ICOS: ICOS befindet sich nach Induktion der Expression dauernd auf der Zelloberfläche, CTLA-4 befindet sich dagegen größtenteils im Zytoplasma der T-Zelle und wird nur während des direkten Kontakts mit der Antigen-präsentierenden Zelle auf der Oberfläche exprimiert [102].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für ICOS-L eine Zunahme während der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen und eine anschließende leichte Abnahme während der Reifung und während der Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Zellen.

### **Zytokine in primären T-Zell-Antworten nach Stimulation mit dendritischen Zellen**

Die Ergebnisse zur Regulation von ICOS-L und CD80-CD86 stützen die Annahme, daß die Signalwege ICOS/ICOS-L und CD28/CD80-CD86 sowohl funktionell als auch zeitlich verschiedene Aufgaben während der T-Zell-Aktivierung übernehmen.

Bei der initialen Aktivierung "naiver" T-Zellen mit SEB-beladenen dendritischen Zellen führte die Unterbrechung des CD28/CD80-CD86 Signalwegs zu einer effektiven Blockade einiger früher Zytokine wie IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , während die Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs nur partiell Einfluß auf die Generierung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  hatte (Abb. 19).

Die Unterbrechung des ICOS/ICOS-L Signalwegs während der initialen Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen hatte keinen Einfluß auf die IL-2 Sekretion (Abb. 19). Dieser Befund ist

passend zu den Daten, die für die Kostimulation über ICOS mit einem monoklonalen Antikörper gezeigt wurden. Dieser Arbeit zufolge hat ICOS Kostimulation keinen Effekt auf die IL-2 Produktion humaner über anti-CD3 vorstimulierter T-Zellen (Ref. [63] und Abb. 22). Kostimulation über CD28 mit einem monoklonalen Antikörper führte dagegen zu einer massiven IL-2 Induktion (Abb. 22 und Ref. [63]). Dieser Befund unterstreicht die besondere Bedeutung des CD28 Signalwegs für die IL-2 Synthese. Der fehlende Einfluß der ICOS Kostimulation auf die IL-2 Synthese läßt jedoch nicht den Umkehrschluß zu, daß die Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs auf die IL-2 Sekretion denselben Effekt haben muß. Es handelt sich bei einer Kostimulation mit monoklonalen Antikörpern und bei einer Blockade um verschiedene experimentelle Systeme. Dennoch zeigten Ergebnisse aus beide Systemen die Unabhängigkeit der IL-2 Sekretion vom ICOS/ICOS-L Signalweg.

Auch andere Arbeiten haben sich mit dem Einfluß des ICOS/ICOS-L Signalwegs auf die IL-2 Sekretion in der initialen Phase der T-Zell-Aktivierung beschäftigt. T-Zell-Rezeptor-transgene CD4<sup>+</sup> Ovalbumin-spezifische T-Zellen aus der Maus wurden nur gering in der IL-2 Sekretion nach Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs durch ein Fusionsprotein beeinflusst. Die Blockade des CD28/CD80-86 Signalwegs mit einem CTLA-4-Fusionsprotein hatte im Vergleich zur Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs einen eindeutig inhibitorischen Effekt auf die IL-2 Freisetzung [64]. Ebenfalls ohne Einfluß auf die IL-2-Sekretion in einer primären Stimulation blieb sowohl die Kostimulation über ICOS mit Hilfe eines ICOS-L-Fusionsproteins bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Maus als auch die Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion mit Hilfe eines ICOS-L-Fusionsproteins in murinen Milzzellen [103].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die IL-2 Sekretion in der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen nicht durch den ICOS/ICOS-L Signalweg beeinflusst wird.

Hinsichtlich anderer Zytokine wurde in dieser Arbeit eine partielle Inhibition der IFN- $\gamma$  Sekretion durch Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs in der primären Stimulation von T-Zellen mit dendritischen Zellen gezeigt (Abb. 19). Dieser Befund wurde durch eine andere Arbeit [103] *in vitro* für CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Maus bestätigt. In dieser Arbeit führte Kostimulation mit einem ICOS-L-Fusionsprotein zu einer deutlichen Erhöhung der IFN- $\gamma$  Sekretion. Dieselbe Arbeit zeigt eine Inhibition von IFN- $\gamma$  nach Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs in Milzzellen der Maus [103].

Ebenfalls zeigte sich eine Blockade der Sekretion des frühen Zytokins TNF- $\alpha$  in der primären Kokultur (Abb. 19).

Der Einfluß des ICOS/ICOS-L Signalwegs auf die IL-4, IL-5 und auf die IL-10 Sekretion in der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen konnte in der primären Stimulation wegen der zu

geringen Mengen an sezernierten Zytokinen nicht abschließend beurteilt werden (Daten nicht gezeigt).

Die vergleichsweise geringen Effekte der ICOS/ICOS-L Blockade aus primären Kokulturen von dendritischen Zellen und T-Zellen zeigen jedoch, daß bei frühen T-Zell-Antworten CD28 gegenüber ICOS hinsichtlich der Zytokinfreisetzung dominierend ist.

### **Zytokine in sekundären T-Zell-Antworten nach Stimulation mit dendritischen Zellen**

Die Ergebnisse aus primären Kokulturen von dendritischen Zellen mit T-Zellen (Abb. 19) sowie verschiedene Experimente *in vitro* und *in vivo* legen die Vermutung nahe, daß ICOS erst in der späteren Phase der Immunantwort eine Rolle spielt [53;64]. Die im Vergleich zu CD28 spätere ICOS-Expression auf T-Zellen läßt eine eventuell den CD28-CD80/CD86 Signalweg ablösende Rolle der Interaktion von ICOS/ICOS-L während der Immunantwort vermuten. Die Interaktion von ICOS-L mit ICOS könnte sich in den Keimzentren abspielen und dort die Aktivierung von T-Zellen aufrechterhalten. Die Kinetik der ICOS Induktion in der Kooperation sowohl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 12) als auch von "naiven" CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 13) mit dendritischen Zellen, deuten darauf hin. CD28 ist im Gegensatz zu ICOS auf diesen T-Zellen bereits vor der Stimulation mit dendritischen Zellen vorhanden (Daten nicht gezeigt). Primäre ruhende T-Zellen sind ICOS negativ, exprimieren jedoch CD28, so daß die CD28 abhängige IL-2 Produktion in Gang gesetzt werden kann. Es kommt unter dem Einfluß von IL-2 zur Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen, bis die Expression von CTLA-4 ein inhibitorisches Signal an die T-Zelle liefert und der Wirkung des CD28 Signalwegs entgegenwirkt [104]. Unter dem Einfluß von ICOS kommt es dann zur Sekretion des Effektorzytokins IL-10 [63].

Die Wirkung der ICOS/ICOS-L Interaktion sollte in späteren Phasen der Immunantwort untersucht werden. Als Modell hierfür konnte eine wiederholte Stimulation von T-Zellen mit dendritischen Zellen dienen.

In dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen System der wiederholten Stimulation von T-Zellen des peripheren Bluts mit SEB-beladenen dendritischen Zellen wird auch nach einer Expansionsphase in IL-2-haltigem Medium ICOS moderat exprimiert (Abb. 17). Im Vergleich dazu geht CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors, trotz Expansion in IL-2-haltigem Medium, relativ zur maximalen Expression zurück, was als Hinweis für eine tatsächlich eingetretene Ruhephase und Proliferationssättigung der T-Zellen zu sehen ist (Abb. 17). Trotz des Rückgangs von CD69

während der Expansionsphase sind die T-Zellen noch immer in einem vor-aktivierten Zustand, da sie hoch die CD45R0 Isoform exprimieren (Abb. 16). Diese Isoform bindet an den T-Zell-Rezeptor und erleichtert die Antigenerkennung [90]. Es handelte sich bei der wiederholten Stimulation von T-Zellen mit dendritischen Zellen um ein System, in dem die zu Gedächtnis-Zellen gewordenen T-Zellen aus der Ruhephase heraus erneut stimuliert werden konnten. Gedächtnis/Effektor-T-Zellen können nach Wiedererkennen von Antigen schnell expandieren, unabhängig von B7- und CD40-Stimulation. Verschiedene Arbeiten haben die Wichtigkeit von ICOS besonders für Gedächtnis-T-Zellen gezeigt. So ist ICOS auf humanen CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen aus der Tonsille exprimiert [63].

Es wurde gezeigt, daß erst die kontinuierliche Stimulation von T-Zellen über die frühen Moleküle CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen die CD28-abhängige Expression von ICOS erhöht. Inhibition der B7 Signale über CD28 führte zu reduzierter ICOS Expression [65]. T-Zellen aus Milzzellen CD80-CD86-defizienter Mäuse exprimierten kein ICOS nach Stimulation über CD3 alleine, während T-Zellen aus Milzzellen von Wildtyp-Mäusen ICOS exprimierten. Erst die kombinierte Zugabe von Antikörpern gegen CD3 und CD28 führte zu einer ICOS Expression [103]. In dieser Arbeit wurde die Expression von ICOS auf T-Zellen in Kokulturen mit dendritischen Zellen durch die verwendeten Blockadereagenzien beeinflusst. In Kokulturen, in denen der CD28/CD80-CD86 Signalweg unterbrochen war, wurde ICOS auf T-Zellen nur schwach exprimiert (Abb. 18).

ICOS wird erst in späteren Phasen der T-Zell-Aktivierung maximal exprimiert [63]. Diese Beobachtung und die Abhängigkeit der ICOS-Expression von Signalen über CD28 zeigen eine Hierarchie und zeitliche definierte Rollen in der Kostimulation, wobei CD28 während des initialen Antigenkontakts das wesentliche Signal zur T-Zell-Kostimulation und zur ICOS-Induktion beiträgt und ICOS erst in der Effektorphase der Immunantwort in die T-Zell-Kostimulation einbezogen wird (Abb. 23).

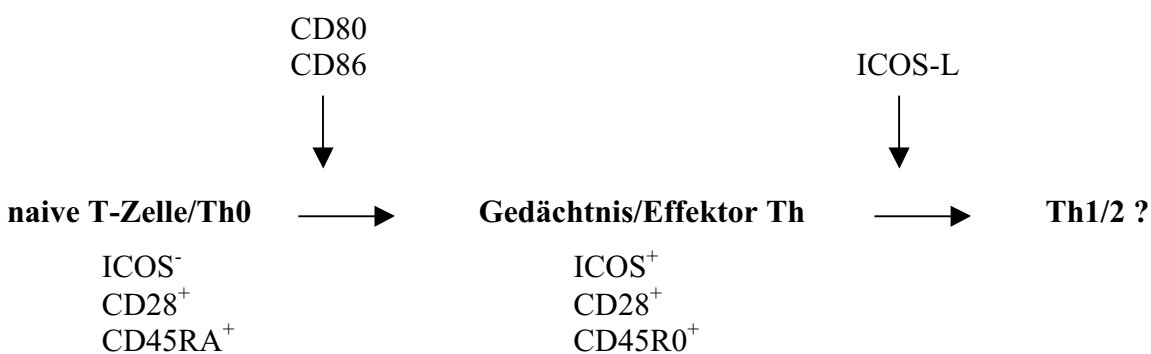


Abb. 23: Mögliche zeitliche Rolle von CD80-CD86 und ICOS-L während einer Immunantwort.

Tatsächlich zeigten sich die Effekte der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen in einer solchen Restimulationssituation (Abb. 20). Interessanterweise führte in dieser Arbeit die Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs in der sekundären Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen zu einer selektiven Blockade der IL-10 Freisetzung von 70 – 80% (Abb. 20). Im Gegensatz dazu hatte Blockade des CD28 Signalwegs einen gegenteiligen Effekt und führte zu einer dramatischen Erhöhung der IL-10 Freisetzung (Abb. 20). Es könnten die aufgrund der CD28 Blockade wenigen ICOS exprimierenden T-Zellen (Abb. 18) für die großen Mengen an sezerniertem IL-10 in diesen Kokulturen verantwortlich sein (Abb. 20).

Die *in vitro* wiederholt mit dendritischen Zellen stimulierten T-Zellen des peripheren Bluts wurden mit Gedächtnis-T-Zellen aus der Tonsille verglichen (Abb. 21). Es ist wahrscheinlich, daß auch CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen aus der Tonsille bereits zu einem früheren Zeitpunkt Antigenkontakt hatten und deshalb nach Isolierung ICOS (zu 90%) und CD69 exprimieren (nicht gezeigt). Im Vergleich zur sekundären Stimulation von Gedächtnis-T-Zellen des peripheren Bluts zeigten primär stimulierte tonsilläre Gedächtnis-T-Zellen ein ähnliches Zytokinprofil nach Blockade der Signalwege ICOS/ICOS-L bzw. CD28/CD80-CD86. Für die Induktion der IL-10 Freisetzung ist ICOS auch bei tonsillären Gedächtnis-T-Zellen entscheidend, durch Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs wurde die IL-10 Sekretion inhibiert und bestätigte die Daten sekundär stimulierter T-Zellen aus dem peripheren Blut. Durch Blockade von CD28/CD80-CD86 Interaktion wurde die IL-10 Sekretion tonsillärer Gedächtnis-T-Zellen nicht beeinflusst. Möglicherweise kommt es nur in T-Zellen des peripheren Bluts zu einer IL-10 Erhöhung nach Blockade von CD28/CD80-CD86, weil diese Zellen während der Differenzierung von "naiven" T-Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen kontinuierlich einer CD28/CD80-CD86 Blockade ausgesetzt waren.

Andere Zytokine wurden in diesem System der Restimulation von T-Zellen aus dem peripheren Blut durch die Blockade von ICOS/ICOS-L nicht beeinflusst oder sogar leicht erhöht. Blockade von CD28/CD80-CD86 dagegen hatte (mit Ausnahme von IL-10) eine Inhibition aller Zytokine zur Folge (Abb. 20).

Die Wichtigkeit von Signalen über ICOS für die IL-10 Freisetzung wurde in dieser Arbeit durch ein anderes System bestätigt (Abb. 22). Kostimulation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3/ICOS zeigte im Vergleich zur Kostimulation von CD3/CD28 die dominante Rolle von ICOS in der IL-10 Freisetzung "naiver" und Gedächtnis-/Effektor-T-Zellen (Abb. 22).

Die Erhöhung der IL-10 Freisetzung nach Blockade des CD28/CD80-CD86 Signalwegs wurde bereits für *Mixed Lymphocyte Reactions* von mononukleären Zellen im humanen System

beschrieben. Während der Interaktion von Effektor-T-Zellen mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen bewirkte ICOS eine Erhöhung und CD28 eine Inhibition der IL-10 Freisetzung [105;106]. Kostimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Maus mit einem ICOS-L-Fusionsprotein ergab eine deutliche Erhöhung der IL-10 Freisetzung [103]. Ein vergleichbarer Befund wurde schon für CD4<sup>+</sup> T-Zellen im humanen System beobachtet, Kostimulation mit einem monoklonalen Antikörper gegen ICOS führte zu einer Erhöhung von IL-10 [63]. Dagegen zeigt eine ICOS-defiziente Maus normale IL-10 Spiegel, was jedoch durch möglich Ausgleichsmechanismen bedingt sein kann [107].

Interessant ist, daß Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs in Kokulturen von T-Zellen mit Endothelzellen, die kein CD80 und CD86 exprimieren, zu einer Blockade aller Effektorzytokine führte [75]. In diesem System werden Effekte von ICOS/ICOS-L sichtbar, die möglicherweise in Anwesenheit von CD80 und CD86 von diesen Molekülen überdeckt werden.

IL-10 ist in der Kooperation von dendritischen Zellen mit T-Zellen von großer Bedeutung. Einerseits wurde beschrieben, daß IL-10 einen inhibitorischen Einfluß auf Antigen-präsentierende Zellen hat, ihre Reifung und Antigen-präsentierenden Fähigkeiten vermindert und auf diese Weise zu einer Abschwächung der Immunantwort führt [12;13;93]. Es wurde gezeigt, daß mit IL-10 behandelte dendritische Zellen wesentlich an der Toleranzinduktion mitwirken [108]. Arbeiten aus unserem Labor zeigten aber auch, daß durch IL-10 Effektorfunktionen in T-Zellen unterstützt werden. So kommt es nach Transfer von Ovalbumin-T-Zell-Rezeptor-transgenen CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> T-Zellen in eine Maus nach Atemwegsprovokation mit Ovalbumin zu einer massiven Entzündungsreaktion der Lunge. Zusätzlich zu diesem Befund wurde in unserem Labor die Beobachtung gemacht, daß T-Zellen, die ICOS hoch exprimieren, mindestens 50% der IL-10 produzierenden Zellen *in vivo* ausmachen (Löhning, M., Manuskript eingereicht). Es ist vorstellbar, dass IL-10 in verschiedenen Kompartimenten unterschiedliche Aufgaben übernimmt. So könnte IL-10 in der Peripherie eine Depression der Immunantwort bewirken (Herunterregulation von Molekülen des MHCII auf Antigen-präsentierenden Zellen). Im Keimzentrum dagegen kann IL-10 die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen fördern und in der Lunge eine Entzündungsreaktion hervorrufen (Löhning, M., Manuskript eingereicht).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die ICOS/ICOS-L Interaktion in der Restimulation von Gedächtnis-T-Zellen zum Tragen kommt und in diesen Zellen zu einer erhöhten IL-10 Freisetzung führt.



### **Einfluß von ICOS/ICOS-L auf die T-Zell-Proliferation**

In dieser Arbeit konnte für die Interaktion von ICOS/ICOS-L keine Beteiligung an der Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit dendritischen Zellen gezeigt werden, während Blockade des CD28/CD80-CD86 Signalwegs die Proliferation stark inhibierte (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung ist passend zu dem Befund, daß die IL-2 Freisetzung unabhängig von der ICOS/ICOS-L Interaktion ist. IL-2 ist ein Zytokin, das vermutlich für die frühe Proliferation von T-Zellen wesentlich verantwortlich ist.

Auch andere Arbeiten zeigten keine Effekte von ICOS/ICOS-L auf die Proliferation. Antikörper gegen ICOS-L hatten in einem ähnlichen System der Restimulation *in vitro* auch bei mehreren Restimulationszyklen keinen Effekt auf die 3HT-Inkorporation bei einer *Mixed Lymphocyte Reaction* mit mononukleären Zellen des peripheren Bluts (Van Gool, S. W.; Vermeiren, J., persönliche Kommunikation). Weiter wurde gezeigt, daß nach Stimulation mit Ovalbumin, ruhende T-Zell-Rezeptor-transgene T-Zellen durch ein ICOS-Fusionsprotein nicht in der Proliferation beeinflusst wurden, wohl aber durch ein CTLA-4-Fusionsprotein [64].

### **Induktion von Th1 oder Th2 durch den Einfluß von ICOS/ICOS-L**

Immer wieder kommt die Diskussion auf, daß die ICOS/ICOS-L Interaktion besonders Einfluß auf Th2-polarisierte Immunantworten hat [64;103]. In dieser Arbeit konnte nach Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs kein eindeutiger Zusammenhang mit Th2-Zytokinen festgestellt werden. Die produzierten Mengen des typischen Th2-Zytokins IL-4 nach Stimulation von T-Zellen mit dendritischen Zellen waren zu gering oder das produzierte IL-4 wurde verbraucht und war deshalb einer Analyse nicht zugänglich (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden in dieser Arbeit verschiedene Reifungsprotokolle ausgetestet, von denen in der Literatur behauptet wurde, daß sie in kokultivierten T-Zellen die Sekretion von Th2-Zytokinen bewirken. Für funktionelle Experimente wurden dendritische Zellen eingesetzt, die mit LPS und PGE<sub>2</sub> ausgereift waren [14;86]. Die Angaben aus der Literatur konnten hier nicht bestätigt werden, es konnte kein Zusammenhang zwischen unterschiedlich ausgereiften dendritischen Zellen und einer vermehrten IL-4 und IL-10 Sekretion kokultivierter T-Zellen festgestellt werden.

Es wird vermutet, daß ICOS-L ein Signal für die IL-4 Produktion ("T-Zell-Hilfe für B-Zellen") liefert, so daß der Immunglobulin-Klassenwechsel stattfinden kann. IgG1 und IgG2a Titer sind in

ICOS-defizienten Mäusen vermindert [107;109;110]. Die Induktion von IL-10 führt dann zur Inhibition von IL-12 durch dendritische Zellen und so zur Abschwächung aggressiver Th1 Antworten [64]. IL-10 könnte anschließend auf dendritische Zellen wirken, so daß sie Th2-Zytokine in T-Zellen hervorrufen. Verschiedene Arbeiten zeigen, daß Neutralisation von IL-10 in Kulturen der dendritischen Zellen zu einer Th1 Induktion in kokultivierten T-Zellen führt [111]. Auch wird ein Einfluß von IL-10 auf die Regulation der Expression von CD80 und CD86 vermutet [11]. Die durch die Interaktion von ICOS/ICOS-L Interaktion induzierte IL-10 Freisetzung könnte bei der Regulation von CD80 und CD86 eine Rolle spielen.

Einige *in vitro* Studien [64;103] lassen vermuten, daß ICOS ein Signal liefert, das die Th2-Zytokinproduktion erleichtert [110]. ICOS-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Induktion einer Th1-Zell-vermittelten Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) und abgeschwächte Th2-Antworten (d. h. CD4<sup>+</sup> T-Zellen dieser Mäuse produzieren nach *in vitro* Restimulation kein IL-4) [107].

Wiederum andere Arbeiten stellen die klare Th2-Beziehung der ICOS/ICOS-L Interaktion in Frage. So wurden Effekte nach Blockade von ICOS während einer EAE, einem klassischen Th1-Modell, gezeigt. Bei Blockade von ICOS/ICOS-L in der frühen Phase kommt es zu einer Verschlechterung der Erkrankung [107;112], während Blockade in der späten Phase zu einer deutlichen Verbesserung führt [112]. Nach Auslösen einer EAE wurde ICOS mRNA in infiltrierenden T-Zellen des Gehirns nachgewiesen. Immunhistologische Analysen bestätigten diesen Befund. Ebenfalls zeigten immunhistologische Untersuchungen eine ICOS Expression auf infiltrierenden mononukleären Zellen im Gewebe von transplantierten Herzen von Mäusen während einer Transplantatabstoßungsreaktion. Die Transplantatabstoßung wird v. a. durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt [112-114].

Somit bleibt weiterhin unklar, ob die ICOS/ICOS-L Interaktion in der Kooperation von dendritischen Zellen mit T-Zellen eine Th2-Differenzierung begünstigt oder aber allgemein auf Gedächtnis/Effektor-T-Zellen wirkt.

### **Mögliche klinische Relevanz**

Eine Unterbrechung des CD28 Signalwegs in der Maus hat eine generelle Abschwächung der Immunantwort zur Folge [37;115]. Erste klinische Anwendung findet die Blockade von CD28-CD80/CD86 Interaktion im Menschen mit einem CTLA-4-Fusionsprotein bei Psoriasis und bei Transplantatabstoßungsreaktionen [116].

Die Untersuchung von ICOS und ICOS-L in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen ergab Effekte auf die Zytokinfreisetzung von T-Zellen nach Stimulation mit dendritischen Zellen. Die Interaktion von ICOS/ICOS-L führte in der Restimulation von Gedächtnis-T-Zellen zu einer starken Erhöhung der IL-10 Sekretion durch Gedächtnis-T-Zellen. Die Blockade von ICOS/ICOS-L ist möglicherweise für klinische Anwendungen von Bedeutung. Es ist denkbar, daß durch eine Unterbrechung des ICOS/ICOS-L Signalwegs selektiv während der Effektorphase in die Immunantwort eingegriffen werden kann und die Blockade von ICOS/ICOS-L ein neues Ziel für eine klinische Intervention bei Immunreaktionen bildet.