

Aus dem Fachbereich Immunologie  
des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums  
und des Robert Koch-Instituts  
Berlin

Dissertation

**Die Rolle des induzierbaren Kostimulators (ICOS) in der  
Kooperation von T- und B-Zellen im entzündeten Gewebe**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Dana Vu Van

Juli 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Chronische Immunreaktionen am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in Kooperation mit der Abteilung Immunologische Abwehrmechanismen am Robert Koch-Institut, Berlin von Januar 2008 bis Juli 2012 unter der Leitung von Dr. Andreas Hutloff angefertigt.

Gutachter: 1. Dr. Andreas Hutloff  
2. Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der Disputation: 07.12.2012

*„Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben.  
Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer,  
es doch noch einmal zu versuchen.“*

*Thomas Alva Edison (1847-1931)*

*Meiner Oma*

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	i
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	iv
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	vi
<b>1 Einleitung</b>	
1.1 Die T-Zell-abhängige, humorale Immunantwort.....	1
1.2 Die Rolle kostimulatorischer Moleküle – ICOS und ICOS-L.....	1
1.3 T-Effektorzellen .....	4
1.3.1 Überblick .....	4
1.3.2 T-Helferzellen vom Typ 1 und 2 (T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Zellen) .....	5
1.3.3 Follikuläre T-Helferzellen (T <sub>FH</sub> ).....	7
1.4 B-Effektorzellen .....	8
1.5 Bedeutung der T- und B-Zellen für die asthmatische Reaktion .....	11
1.6 B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen.....	12
1.7 Ausgangspunkt der Arbeit und Zielstellung.....	13
<b>2 Material und Methoden</b>	
2.1 Geräte und Softwareprogramme.....	15
2.2 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien .....	15
2.3 Puffer, Lösungen und Medien .....	18
2.4 Monoklonale Antikörper (mAK).....	20
2.5 Tierexperimentelle Methoden.....	21
2.5.1 Mäuse .....	21
2.5.3 Immunisierung der Tiere .....	22
2.5.3.1 Herstellung des Nitrophenol-Ovalbumin (NP-OVA)-Konjugats .....	22
2.5.3.2 Kopplung von NP-OVA an ALUM (Aluminiumhydroxid).....	23
2.5.3.3 Intranasale Antigengabe .....	23
2.6 Zellbiologische Methoden .....	23
2.6.1 Isolierung muriner Zellen.....	23
2.6.1.1 Isolierung von Zellen aus der Milz.....	23
2.6.1.2 Isolierung von Zellen aus der Lunge .....	24
2.6.1.3 Isolierung von Zellen aus dem Lymphknoten .....	24
2.6.2 Magnetische Zellsortierung (MACS®) .....	24
2.6.3 Zellzählung .....	25
2.6.4 Analyse der Zytokinproduktion.....	25
2.6.5 Durchflusszytometrie .....	26
2.6.5.1 Markierung von Zelloberflächenproteinen.....	26
2.6.5.2 Darstellung von intrazellulären Proteinen .....	26

2.6.5.3	Messung der Zellproliferation mittels CFSE.....	27
2.6.5.4	Analyse der durchflusszytometrischen Daten .....	27
2.6.6	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung .....	28
2.6.7	<i>In vitro</i> T <sub>H</sub> 2-Polarisierung von T-Lymphozyten .....	28
2.7	Immunhistochemie (IHC).....	29
2.7.1	Silanisieren von Objektträgern .....	29
2.7.2	Gewebeaufarbeitung.....	29
2.7.3	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	29
2.7.4	Indirekte Immunperoxidasetechnik.....	29
2.7.5	PAS-Färbung .....	30
2.7.6	Bronchoalveolar-Lavage (BAL) und Diff-Quick® Färbung.....	30
2.7.7	Bearbeitung histologischer Aufnahmen .....	31
2.8	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ...	31
2.8.1	Gewinnung von Serum .....	31
2.8.3	Messung von IL-2 im Zellkulturüberstand.....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Etablierung eines murinen Atemwegsinfektionsmodells .....	33
3.1.1	Grundlegende Überlegungen.....	33
3.1.2	Basisprotokoll des Atemwegsinfektionsmodells.....	33
3.1.3	Wirkung von LPS auf die T-Zell-Aktivierung .....	35
3.1.6	Durch <i>in vitro</i> T <sub>H</sub> 2-Polarisierung der T-Zellen kann die Zahl an Eosinophilen in der Lunge erhöht werden .....	41
3.1.7	Vergleich des neuen Modells mit einem Standardmodell .....	43
3.2	Globale Bedeutung von ICOS im entzündeten Gewebe.....	46
3.2.1	Modellsystem zur Untersuchung der globalen Rolle von ICOS .....	46
3.2.2	ICOS fördert die Expansion naiver antigenspezifischer T- und B-Zellen.....	47
3.2.3	ICOS ist wichtig für die Differenzierung der T- und B-Zellen zu Follikulären T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen .....	50
3.2.4	Die <i>in vitro</i> T <sub>H</sub> 2-Polarisierung der T-Zellen kann den <i>in vivo</i> Expansionsdefekt nicht kompensieren.....	51
3.3	Rolle von ICOS in der Interaktion von T- und B-Zellen im Verlauf einer T-Zell-abhängigen Immunantwort .....	55
3.3.1	Modellsystem zur Untersuchung der Rolle von ICOS in der T-DZ- vs. T-B-Interaktion.....	55
3.3.2	Die Expansion der antigenspezifischen T- und B-Zellen ist von ICOS-L auf B-Zellen unabhängig.....	57
3.3.3	Follikuläre T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen sind nicht auf die T-B-Interaktion über ICOS/ICOS-L angewiesen.....	58
3.3.4	Die Aufrechterhaltung der T <sub>H</sub> 2-Effektorfunktionen in der Lunge ist von der Kostimulation über ICOS abhängig.....	63

3.3.5	Plasmazellen entwickeln sich unabhängig von der Kostimulation über ICOS .....	68
3.3.6	Der Klassenwechsel zu bestimmten Isotypen wird von ICOS differenziell reguliert .....	71
3.3.7	B-Gedächtniszellen sind auf die ICOS/ICOS-L-Interaktion mit T-Zellen angewiesen .....	73
3.4	Die Rolle von ICOS für die antigenpräsentierende Funktion von B-Zellen im entzündeten Gewebe .....	75
3.4.1	Die antigenpräsentierende Funktion von B-Zellen wird durch ICOS positiv beeinflusst .....	75
3.4.2	Die Interaktion von ICOS/ICOS-L zwischen T- und B-Zellen findet im Verlauf der Atemwegsentzündung in Bronchus-assoziierten lymphoiden Strukturen statt .....	77
3.4.3	Keimzentrums-ähnliche B-Zellen aber nicht Follikuläre T-Helferzell-ähnliche Zellen lassen sich im Lungengewebe finden .....	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Etablierung eines neuartigen Atemwegsinflamationsmodells .....	84
4.2	Die Rolle von ICOS/ICOS-L in der Interaktion von T- und B-Zellen .....	86
4.2.1	Einfluss auf die klonale Expansion antigenspezifischer T- und B-Zellen .....	86
4.2.2	Einfluss auf die Differenzierung zu Follikulären T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen .....	88
4.2.3	Einfluss auf die Entstehung von T- und B-Effektorzellen .....	90
4.3	Rolle der B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen im entzündeten Gewebe .....	100
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>121</b>
	<b>SUMMARY .....</b>	<b>122</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>123</b>
	<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....</b>	<b>124</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>125</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>126</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A700	Alexa Fluor® 700
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AFZ	autofluoreszente Zellen
APRIL	<i>A proliferating-inducing ligand</i>
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveolar-Lavage
BALT	<i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i>
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
Blimp-1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinder-Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CCR7	CC-Chemokin-Rezeptor 7
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CSR	<i>class-switch recombination</i> ; Immunglobulin-Klassenwechsel
CVID	<i>combined variable immunodeficiency</i>
CXCR5	CXC-Chemokin-Rezeptor 5
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dH <sub>2</sub> O	einfach destilliertes Wasser
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle(n)
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i> ; Enzym-gekoppelter Immuno-Adsorptionstest
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> ; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	<i>fetal calf sera</i> ; Fötales Kälberserum
FDZ	Follikuläre Dendritische Zelle(n)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> ; Vorwärtsstreulicht
GATA-3	<i>GATA-binding protein 3</i>
HEL	<i>hen egg lysomzyme</i>
i. n.	intranasal
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
ICOS	<i>inducible costimulator</i> ; induzierbarer Kostimulator
ICOS-L	<i>inducible costimulator ligand</i> ; Ligand des induzierbaren Kostimulators
Id2	<i>inhibitor of DNA binding/differentiation</i>
IFN	<i>interferon</i> ; Interferon
Ig	<i>immunoglobulin</i> ; Immunglobulin
IL	<i>interleukin</i> ; Interleukin
KO	<i>knock-out</i>



KZB	Keimzentrums-B-Zelle(n)
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> ; magnetische Zellsortierung
mAK	monoklonaler Antikörper
MBP	<i>major basic protein</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-II	<i>major histocompatibility complex class II</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
Min.	Minute
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NP	Nitrophenol
OVA	Ovalbuminprotein
OVA <sub>323-339</sub>	Ovalbuminpeptid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Azetat
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
Rag	<i>recombination activating gene</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>SLAM-associated protein</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> ; schwerer kombinierter Immunschwächedefekt
Sek.	Sekunde
SHM	<i>somatic hypermutation</i> ; somatische Hypermutation
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation molecule</i>
SLE	<i>systemic lupus erythematosus</i>
SSC	<i>sideward scatter</i> ; Seitwärtsstreulicht
STAT6	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
T <sub>FH</sub>	<i>T follicular helper cells</i> ; Follikuläre T-Helferzelle(n)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzelle vom Typ 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzelle vom Typ 2
TIGIT	<i>T cell immunoglobulin and ITIM domain</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>unit</i>
ü. N.	über Nacht
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtyp

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.	Kostimulatorische Moleküle der B7/CD28 Immunglobulin-Superfamilie und TNF/TNFR-Superfamilie. ....	4
Abbildung 2.	Differenzierung verschiedener T-Helfer-Subpopulationen. ....	5
Abbildung 3.	Differenzierung von B-Effektorzellen. ....	10
Abbildung 4.	Ablauf der allergischen Immunantwort. ....	12
Abbildung 5.	Analyse der durchflusszytometrischen Daten. ....	28
Abbildung 6.	Murines Atemwegsinflammationsmodell. ....	34
Abbildung 7.	Wirkung von LPS auf die T-Zell-Aktivierung. ....	36
Abbildung 8.	Wirkung von LPS auf die B-Zell-Aktivierung. ....	38
Abbildung 9.	Einfluss von LPS auf die Einwanderung von Granulozyten ins Lungengewebe. ....	40
Abbildung 10.	Effekte der <i>in vitro</i> T <sub>H</sub> 2-Polarisierung. ....	42
Abbildung 11.	Vergleich des neuen Modells mit dem Standardmodell der aktiven Sensibilisierung. ....	45
Abbildung 12.	Adoptives Transfersystem zur Untersuchung der globalen Effekte von ICOS. ....	47
Abbildung 13.	Einfluss der ICOS-Kostimulation auf die Expansion naiver, antigenspezifischer T- und B-Zellen. ....	49
Abbildung 14.	Differenzierung von Follikulären T-Helferzellen (T <sub>FH</sub> ) und Keimzentrums-B-Zellen (KZB) in Abhängigkeit von ICOS. ....	51
Abbildung 15.	Einfluss von ICOS auf die Expansion von T-Effektorzellen. ....	54
Abbildung 16.	Adoptives Transfersystem zur Untersuchung spezieller Effekte von ICOS. ....	56
Abbildung 17.	Einfluss von ICOS-L auf die Expansion antigenspezifischer T- und B-Zellen. ....	58
Abbildung 18.	Bedeutung der ICOS-L Expression für die T <sub>FH</sub> -Zellentwicklung. ....	60
Abbildung 19.	Einfluss der ICOS-L-Expression auf B-Zellen auf die Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen. ....	62
Abbildung 20.	Zytokinproduktion durch T-Effektorzellen aus dem Lymphknoten und der Lunge. ....	64
Abbildung 21.	Relevanz von ICOS-L für T <sub>H</sub> 2-Effektorfunktionen. ....	66
Abbildung 22.	Einfluss von ICOS-L auf die Zahl eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe. ....	68
Abbildung 23.	Einfluss der ICOS/ICOS-L-Interaktion auf die Differenzierung von Plasmazellen. ....	70
Abbildung 24.	Einfluss der ICOS/ICOS-L-Interaktion auf den Immunglobulin-Klassenwechsel. ....	72
Abbildung 25.	Rolle von ICOS-L für die Aufrechterhaltung von B-Gedächtniszellen. ....	74
Abbildung 26.	Experimentelles System zum Nachweis der antigenpräsentierenden Funktion von B-Zellen. ....	76
Abbildung 27.	B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APZ). ....	77
Abbildung 28.	Antigenspezifische T- und B-Zellen im zellulären Infiltrat. ....	78

Abbildung 29. Histologischer Nachweis tertiärer, lymphoider Strukturen im Lungengewebe.....	80
Abbildung 30. Phänotypisierung von antigenspezifischen T- und B-Zellen im Lungengewebe hinsichtlich eines Keimzentrums- bzw. T-Helferzell-ähnlichen Phänotyps.....	82
Tabelle 1. Verwendete monoklonale Antikörper.....	20

# 1 Einleitung

## 1.1 Die T-Zell-abhängige, humorale Immunantwort

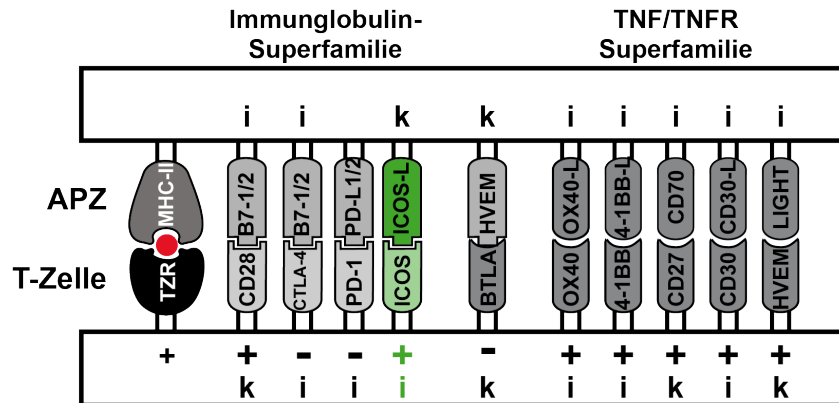
Die Generierung einer lang anhaltenden, wenn möglich, lebenslangen Immunität gegenüber bestimmten Krankheitserregern ist das Kernprinzip jeder Impfung. Die protektive Immunität, die dabei induziert wird, gründet sich auf die Bildung hochaffiner Antikörper, die von antikörpersezernierenden Plasmazellen produziert werden. Um wirkungsvolle Antikörperantworten gegenüber Proteinantigenen zu induzieren, sind B-Zellen allein nicht ausreichend. B-Zellen können ein Antigen über ihren antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor (BZR) detektieren, wobei die Form, in der das Antigen den B-Zellen präsentiert wird, variieren kann (Batista und Harwood, 2009). So kann Antigen in löslicher Form, an Makrophagen gebunden oder über Follikuläre Dendritische Zellen (FDZ) präsentiert werden, die das Antigen in Form von Immunkomplexen auf der Oberfläche tragen. Durch Bindung an das Antigen kommt es zur Signalgebung über den BZR. Wird dabei ein bestimmter Schwellenwert überschritten, werden die B-Zellen aktiviert. Zum anderen erfolgt die rezeptorvermittelte Internalisierung des Antigens, die mit der intrazellulären Prozessierung und letztendlich Präsentation von Peptidfragmenten einhergeht, die an MHC-II-Molekülen (*major histocompatibility complex II*) gebunden vorliegen. Die B-Zell-Aktivierung ist mit der Transkription einer Reihe von Genen verbunden, die u.a. auch ihre Wanderung in Richtung T-Zell-Zone bewirkt. An der Grenze zwischen T- und B-Zell-Zone treffen sie auf T-Zellen, die die gleiche Antigen-spezifität besitzen und zuvor durch Dendritische Zellen (DZ) aktiviert worden sind (Garside, 1998). Die T-Zellen sind in der Lage, Peptid-MHC-II-Komplexe auf der Oberfläche der B-Zellen zu erkennen und über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) daran zu binden. Infolgedessen aktivieren sich T- und B-Zellen wechselseitig, indem die Expression bestimmter membranständiger Moleküle induziert oder verstärkt wird und die Sekretion von Zytokinen erfolgt. Das Prinzip der gekoppelten Antigenerkennung (*linked recognition*) ist ein Sicherungssystem, das destruktive Immunantworten gegenüber körpereigenen Strukturen oder harmlosen Umweltantigenen verhindert und somit die Selbsttoleranz aufrechterhält. In der Impfstoffentwicklung wird dieses Prinzip genutzt, um effektive Antikörperantworten auch gegen Antigene auszulösen, die eigentlich nur schwach immunogen sind.

## 1.2 Die Rolle kostimulatorischer Moleküle – ICOS und ICOS-L

Ein funktionierendes Immunsystem setzt die optimale Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen voraus, denn nur so kann einerseits eine wirkungsvolle Immunantwort

gegenüber Pathogenen induziert werden und andererseits gegenüber harmlosen Umweltantigenen ausbleiben. Wie gezeigt werden konnte, führt die Erkennung eines spezifischen Antigens über den TZR-Komplex allein dazu, dass T-Zellen entweder in Apoptose gehen oder in einen Zustand der Reaktionslosigkeit (Anergie) versetzt werden (Lamb, 1983). Um vollständig aktiviert zu werden, benötigen T-Zellen ein zweites, sogenanntes kostimulatorisches Signal, das es den T-Zellen erlaubt, „fremd“ und „gefährlich“ von „selbst“ und „ungefährlich“ zu unterscheiden (Lafferty, 1975; Bretscher, 1970; Bretcher, 1999). Das erste Signal über den TZR wird über ein spezifisches Antigen vermittelt. Das zweite, kostimulatorische Signal dagegen ist nicht unmittelbar an das Antigen gebunden. Kostimulatorische Moleküle sind dabei Oberflächenmoleküle, die nicht in der Lage sind, T-Zellen eigenständig zu aktivieren, aber dazu dienen, das TZR-Signal zu verstärken oder zu inhibieren (Kroczeck, 2004). Sie führen damit zu einer Modulation des initialen TZR-Signals und entscheiden, ob eine Immunantwort ausgelöst wird oder nicht. Die Mehrheit der kostimulatorischen Moleküle kann strukturell zwei Proteinfamilien zugeordnet werden, der B7/CD28 Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)/TNF-Rezeptor Familie (Abbildung 1). Beide Proteinfamilien enthalten Moleküle, die entweder konstitutiv exprimiert, oder erst nach Aktivierung auf der Zelloberfläche der T-Zellen gebildet werden. In den letzten Jahren sind eine Reihe neuer, kostimulatorischer Moleküle entdeckt worden und es wird angenommen, dass verschiedene Signale notwendig sind, um in jeder gegebenen Situation eine möglichst effiziente T-Zell-Antwort zu induzieren. Im Einklang damit steht, dass sich kostimulatorische Moleküle in ihrer Wirkung nicht nur funktionell, sondern auch räumlich und zeitlich voneinander unterscheiden (Watts, 2005). CD28 beispielsweise wird auf naiven, aber auch aktivierten T-Zellen konstitutiv exprimiert und die Expression seiner Liganden CD80/86 ist auf lymphoides Gewebe beschränkt. Der induzierbare Kostimulator ICOS dagegen wird erst nach Aktivierung auf T-Zellen hochreguliert und sein Ligand kommt in lymphoiden aber auch nicht-lymphoiden Geweben vor. Die funktionelle Hierarchie, die sich aus dem zeitlichen und räumlichen Wirkungskreis einzelner Kostimulatoren ergibt, macht deutlich, dass nicht nur naive, antigenunerfahrene T-Zellen von einer Kostimulation abhängig sind, sondern auch T-Effektor- und T-Gedächtniszellen über kostimulatorische Signale reguliert werden müssen (Sharpe and Freeman, 2002). Infolge der Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wird ein kostimulatorischer Dialog in Gang gesetzt, der durch die Interaktion von CD28-CD80/86 ausgelöst wird und dazu dient, die initialen Signale zu erhalten oder zu modifizieren. Dabei wird über den Kostimulator ein quantitatives oder qualitatives Signal vermittelt (Croft, 2003). Die Fähigkeit dieser Moleküle, die Intensität und Effektivität einer Immunantwort zu bestimmen, macht sie damit zu attraktiven, therapeutischen Zielstrukturen in der Behandlung von Allergien und Autoimmunität (Kallinich, 2005; Kroczeck und Hamelmann, 2005).

Der induzierbare Kostimulator ICOS (*inducible costimulator*) ist ein zu CD28 strukturell und funktionell ähnliches Molekül, das erstmals im humanen System auf tonsillären T-Zellen beschrieben wurde (Hutloff, 1999). Studien in der Maus bestätigten die Expression auf aktivierten T-Zellen und zeigten, dass ICOS von CD4<sup>+</sup> aber auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert werden kann. Darüber hinaus wurde eine langanhaltende Expression auf T-Effektorzellen und später auch regulatorischen T-Zellen beschrieben (Yoshinaga, 1999; Akbari, 2002; Ito, 2008; Burmeister, 2008). Der Ligand für ICOS (ICOS-L, alternativ auch B7RP-1 [*B7-related protein 1*, Yoshinaga, 1999], B7h [Swallow, 1999; Mages, 2000], LICOS [*ligand for ICOS*, Brodie, 2000], GL50 [Ling, 2000], B7-H2 [Wang, 2000]) wurde nahezu zeitgleich zu ICOS beschrieben (Yoshinaga, 1999). Strukturell handelt es sich bei ICOS und ICOS-L um Transmembranproteine vom Typ I, die Sequenzhomologien zu CD28 bzw. CD80/86 aufweisen (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999; Swallow 1999). ICOS selbst wird als glykosyliertes, Disulfid-verbundenes Homodimer exprimiert (Hutloff, 1999; Mages, 2000; Beier, 2000), ICOS-L dagegen als Monomer (Yong, 2009). Darüber hinaus konnten für ICOS-L zwei Splicevarianten gefunden werden (Ling, 2001). Im Unterschied zu CD28 wird ICOS von T-Zellen erst nach Aktivierung auf der Oberfläche exprimiert, wobei die Expression durch den TZR und über CD28 beeinflusst werden kann (Beier, 2000; McAdam, 2000). ICOS-Ligand dagegen kann konstitutiv auf verschiedenen Zellen des lymphoiden Gewebes (Milz, Lymphknoten, Thymus) gefunden werden, so beispielsweise auf B-Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen (Yoshinaga, 1999; Swallow, 1999; Ling, 2000) und eine Expression auf Zellen des nicht-lymphoiden Gewebes (z.B. Endothelzellen) kann durch verschiedene Signale (Lipopolysaccharid [LPS], Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], Interferon- $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ]) induziert werden (Swallow, 1999; Khayyamian, 2002). Die Interaktion von ICOS und ICOS-L vermittelt ein positives, kostimulatorisches Signal, das mit einer verstärkten Proliferation, gesteigerten Zytokinproduktion und erhöhten B-Helfer-Funktion der T-Zellen einhergeht (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999). Die Signaltransduktion verläuft einseitig über ICOS. ICOS besitzt zytoplasmatisch ausschließlich eine Bindestelle für die p85 Untereinheit der Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (PI3K) (Coyle, 2000) und im Vergleich zu CD28 wird über ICOS eine stärkere Aktivierung der PI3K initiiert (Arimura, 2002; Parry, 2003). Bewirkt wird dies durch die Rekrutierung der p50 $\alpha$  Untereinheit der PI3K durch ICOS, die eine stärkere Aktivierung der PI3K auslöst (Fos, 2008). CD28 kann neben dem PI3K-Signaltransduktionsweg noch weitere Signaltransduktionswege auslösen (Acuto und Michel, 2003). CD28-defiziente Mäuse sind unfähig, eine wirkungsvolle T-Zell-abhängige Immunantwort einzuleiten (Shahinian, 1993), ICOS-defiziente Mäuse dagegen zeigen eine humorale Immunantwort, die zwar vermindert ist, dennoch ablaufen kann (McAdam, 2001; Tafuri, 2001; Dong, 2001). Damit wird deutlich, dass beide Rezeptormoleküle gleiche, aber auch unterschiedliche Signalkaskaden nutzen und sich in ihren Funktionen teilweise überschneiden.



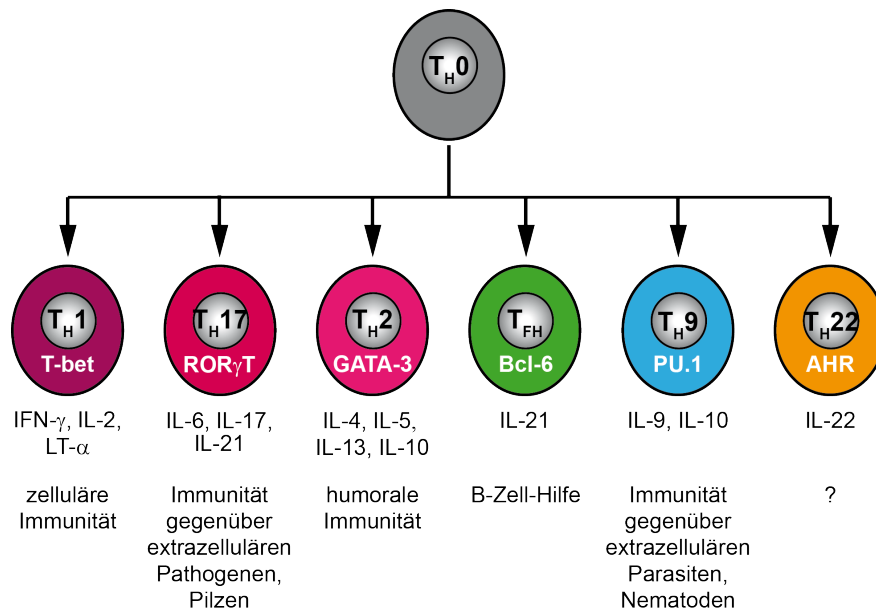
**Abbildung 1. Kostimulatorische Moleküle der B7/CD28 Immunoglobulin-Superfamilie und TNF/TNFR-Superfamilie.**

Schematische Darstellung einer Auswahl an Rezeptor-Liganden-Paaren der B7/CD28 Immunoglobulin-Superfamilie und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)/TNF-Rezeptor-Superfamilie. Nachdem ein positives Signal in die T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor (TZR) vermittelt worden ist, wird das TZR-Signal durch verschiedene kostimulatorische Molekülinteraktionen modifiziert, die entweder ein kostimulatorisches (+) oder koinhibitorisches (-) Signal vermitteln. k konstitutiv exprimiert; i induzierbar; APZ antigenpräsentierende Zelle; MHC-II *major histocompatibility complex-II* (Haupthistokompatibilitätskomplex II).

## 1.3 T-Effektorzellen

### 1.3.1 Überblick

CD4<sup>+</sup> T-Zellen können in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden, die durch einen spezifischen Mastertranskriptionsfaktor definiert werden und sich durch unterschiedliche Effektorfunktionen auszeichnen. Eine Auswahl der gegenwärtig bekannten CD4<sup>+</sup> T-Helferzell-Subpopulationen zeigt Abbildung 2.



**Abbildung 2. Differenzierung verschiedener T-Helfer-Subpopulationen.**

Naive T-Zellen (T<sub>H0</sub> T-Zellen) entwickeln sich zu verschiedenen T-Helfer-Subpopulationen, die jeweils durch einen spezifischen Transkriptionsfaktor gekennzeichnet sind. Die entstandenen T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) zeichnen sich durch die Produktion unterschiedlicher Effektorzytokine aus und unterscheiden sich in ihren Effektorfunktionen. IL Interleukin; IFN Interferon; T-bet *T-box expressed in T cells*; ROR $\gamma$ T *retinoid acid-related orphan receptor  $\gamma$ T*; GATA-3 *GATA-binding protein 3*; Bcl-6 *B-cell lymphoma 6*; AHR *Aryl hydrocarbon receptor* (Dong und Martinez, 2010).

### 1.3.2 T-Helferzellen vom Typ 1 und 2 (T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Zellen)

Die vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind eine Grundvoraussetzung dafür, dass das Immunsystem möglichst wirkungsvoll auf verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre Pathogene reagieren kann. Mosman und Coffman waren die ersten, die zeigen konnten, dass sich T-Zellen funktionell unterscheiden (Mosman und Coffman, 1986). Der funktionelle Unterschied gründete sich dabei auf die Zytokine, die sie produzierten und so wurden Zellen, die vor allem IFN- $\gamma$  sekretierten als T-Helferzellen vom Typ 1 (T<sub>H</sub>1), solche die hauptsächlich Interleukin-4 (IL-4) und IL-5 produzierten als T-Helferzellen vom Typ 2 (T<sub>H</sub>2) bezeichnet. Die Fähigkeit dieser Zellen, ein bestimmtes Repertoire an Effektorzytokinen auszuschütten, definiert ihre biologische Funktion und so wurde schnell klar, dass T<sub>H</sub>1-Zellen vor allem zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, T<sub>H</sub>2-Zellen dagegen für die Beseitigung extrazellulärer Pathogene wichtig sind. T<sub>H</sub>1-Zellen sind damit Bestandteil der zellulären Immunabwehr. Die Identifizierung des Mastertranskriptionsfaktors T-bet (*T-box expressed in T cells*), der notwendig und ausreichend war, um die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1-Zellen zu induzieren (Szabo, 2000), definierte diese Zellen als eigenständige T-Zellsubpopulation. Über die Sekretion von IFN- $\gamma$  können T<sub>H</sub>1-Zellen Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Natürliche Killerzellen) rekrutieren und aktivieren, die



daraufhin intrazelluläre Erreger wirkungsvoll bekämpfen können (Mosmann und Coffman, 1989). Obwohl T<sub>H</sub>1-Zellen keine B-Helfer-Tätigkeit besitzen, sind T<sub>H</sub>1-gerichtete Immunantworten in der Maus mit der Produktion von Immunglobulin-2a (IgG2a), im Menschen von IgG1 durch B-Zellen verbunden (Mosmann und Coffman, 1989).

T<sub>H</sub>2-Zellen sind entscheidend für die humorale und damit Antikörper-vermittelte Immunantwort, da sie durch die Freisetzung von IL-4, -5 und -13 B-Zellen effektiv aktivieren und die Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen, insbesondere von IgE<sup>+</sup> Plasmazellen, induzieren können (Mosmann und Coffman, 1989). Damit gelingt es ihnen, Erreger zu bekämpfen, die auch in extrazelluläre Bereiche des Körpers eingedrungen sind. Der Mastertranskriptionsfaktor der T<sub>H</sub>2-Zellen ist GATA-3 (Zhang, 1997; Zheng und Flavell, 1997). GATA-3 (*GATA-binding protein 3*) wird kontinuierlich von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der gesamten T-Zellentwicklung exprimiert, wobei das Expressionslevel während der Entwicklung von einem Thymozyten zur T<sub>H</sub>2-Zelle ansteigt (Ho, 2009). Des Weiteren wird die GATA-3-Expression während der Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Zellen durch IL-4 induziert und über STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) vermittelt (Ouyang, 1998). Darüber hinaus sind jedoch auch alternative STAT6-unabhängige Wege bekannt (Amsen, 2007; Fang, 2007). Nach der Aktivierung der T-Zellen über ihren TZR und CD28 wird GATA-3 durch die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) p38 phosphoryliert und aktiviert, wodurch die Translokation in den Zellkern bewirkt wird (Maneechotesuwan, 2007). Funktionell bewirkt GATA-3 eine erhöhte Zugänglichkeit für den Genlocus von *il4*, *il5* und *il13*, infolgedessen die Gene transkribiert und die Zytokine sekretiert werden können (Lee, 2000). GATA-3 selbst initiiert jedoch nur die Transkription von *il5* und *il13*, die Transkription von *il4* ist von GATA-3 unabhängig (Zhang, 1998).

Das durch T<sub>H</sub>2-Zellen induzierte IgE bindet auf Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, die den entsprechenden hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI) tragen. Durch Quervernetzung der Rezeptoren werden diese Zellen aktiviert, infolgedessen sie hochtoxische, präformierte und neu synthetisierte Mediatoren freisetzen, die den Parasiten wirkungsvoll bekämpfen.

Die Generierung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen kann *in vitro* durch den Zusatz bestimmter Zytokine erreicht werden und so ist IL-4 ausreichend, um die Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Zellen zu induzieren (Le Gros, 1990; Swain, 1990). Interleukin-12 dagegen kann dazu dienen, einen T<sub>H</sub>1-Zell-Phänotyp zu generieren (Seder, 1993). Beide Zelltypen können sich dabei in ihrer Entstehung wechselseitig inhibieren (Gajewski und Fitch, 1988). Die Art der Signale und deren Herkunft, die *in vivo* notwendig sind, um einen T<sub>H</sub>1- und insbesondere einen T<sub>H</sub>2-Zell-Phänotyp zu induzieren, sind nicht genau bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass T-Zellen im Kontakt mit Dendritischen Zellen bestimmte (lösliche und/oder membrangebundene) Differenzierungssignale erhalten. Neuere Erkenntnisse deuten

sogar darauf hin, dass eine klare Unterscheidung beider T-Zell-Subtypen *in vivo* nicht immer möglich ist. So kann die Plastizität einer T-Zelle selbst dann noch aufrechterhalten werden, wenn sie bereits einen bestimmten T-Helferzell-Phänotyp aufweist (Hegazy, 2010).

### 1.3.3 Follikuläre T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>)

Follikuläre T-Helferzellen sind essenziell, um eine effiziente, T-Zell-abhängige Immunantwort auszulösen. Der Verlust von T<sub>FH</sub>-Zellen geht mit einer beeinträchtigten humoralen Immunantwort einher, die sich in einer verminderten Keimzentrumsbildung und damit verminderten Frequenz an Plasmazellen und B-Gedächtniszellen äußert. T<sub>FH</sub>-Zellen wurden erstmals im humanen System beschrieben, als eine T-Zell-Subpopulation, die sich durch die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 auszeichnet und B-Helfer-Funktion besitzt (Schaerli, 2000; Breitfeld 2000). Die Identifizierung von Bcl-6 (*B cell lymphoma 6*) als den Mastertranskriptionsfaktor von T<sub>FH</sub>-Zellen (Johnston, 2009; Nurieva, 2009; Yu, 2009) machte diese Zellen zur eigenständigen T-Zell-Subpopulation. T-Zellen aus Bcl-6-defizienten Mäusen sind somit nicht in der Lage, zu T<sub>FH</sub>-Zellen zu differenzieren, die Generierung anderer T-Helferzell-Populationen dagegen bleibt unbeeinträchtigt (Yu, 2009). Bcl-6 fungiert als transkriptionelles Repressorprotein (Shaffer, 2000). Wie gezeigt werden konnte, wird die Differenzierung zu anderen T-Helfer-Subpopulationen durch Bcl-6 inhibiert (Nurieva, 2009). Auf welche Weise Bcl-6 die Differenzierung der T<sub>FH</sub>-Zellen bewirkt, ist jedoch immer noch wenig untersucht (Crotty, 2011).

T<sub>FH</sub>-Zellen sind durch eine Reihe spezifischer, phänotypischer Merkmale gekennzeichnet, die ihre Funktion als B-Helfer-Zellen verdeutlicht. Nach ihrer Aktivierung durch Dendritische Zellen beginnen T-Zellen den Chemokinrezeptor CXCR5 auf ihrer Oberfläche zu bilden (Ansel, 1999; Sallusto, 1999). Die zeitgleiche Herunterregulation von CCR7, einem Chemokinrezeptor, der ihre Wanderung in die T-Zell-Zone bedingt (Warnock, 1998; Förster, 1999), lässt sie in Richtung des B-Zell-Folikels migrieren (Haynes, 2007). Die Migration zur B-Zell-Zone ermöglicht es ihnen erst, mit den B-Zellen zu kommunizieren. BTLA (*B- and T-lymphocyte attenuator*; M'Hidi, 2009), ICOS (Akiba, 2005), TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*; Seth, 2009) und PD-1 (*programmed cell death protein 1*; Haynes, 2007) werden auf besonders hohem Niveau von T<sub>FH</sub>-Zellen exprimiert und überwiegend auch genutzt, um diese Zellen durchflusszytometrisch zu analysieren. Es wird angenommen, dass die parallele Expression kostimulatorischer (ICOS) und koinhibitorischer (PD-1, TIGIT, BTLA) Signale dazu dient, der Langzeitstimulation über den TZR entgegenzuwirken, die durch die anhaltende Interaktion mit ihren entsprechenden Partner-B-Zellen entsteht (Crotty, 2011).

Interleukin-21 wird, wenn auch nicht ausschließlich, von T<sub>FH</sub>-Zellen in starkem Maße exprimiert (Nurieva, 2008; Suto, 2008). Die Sekretion von IL-4 durch T<sub>FH</sub>-Zellen gilt ebenfalls als gesichert

(Reinhardt, 2009; Yusuf, 2010). Man geht derzeitig davon aus, dass die Differenzierung einer naiven T-Zelle zu einer T<sub>FH</sub>-Zelle in einem Mehrschrittprozess verläuft, wobei sowohl der Kontakt mit Dendritischen Zellen als auch mit B-Zellen wichtig ist, um Bcl-6 zu induzieren und aufrechtzuerhalten (Deenick, 2010; Goenka, 2011; Baumjohann, 2011; Choi, 2011). Welche Molekülinteraktionen im Einzelnen zwischen den Zell-Interaktionspartnern wichtig sind und welche spezielle Rolle die Interaktion von ICOS mit ICOS-L dabei spielt, bleibt noch zu zeigen.

## 1.4 B-Effektorzellen

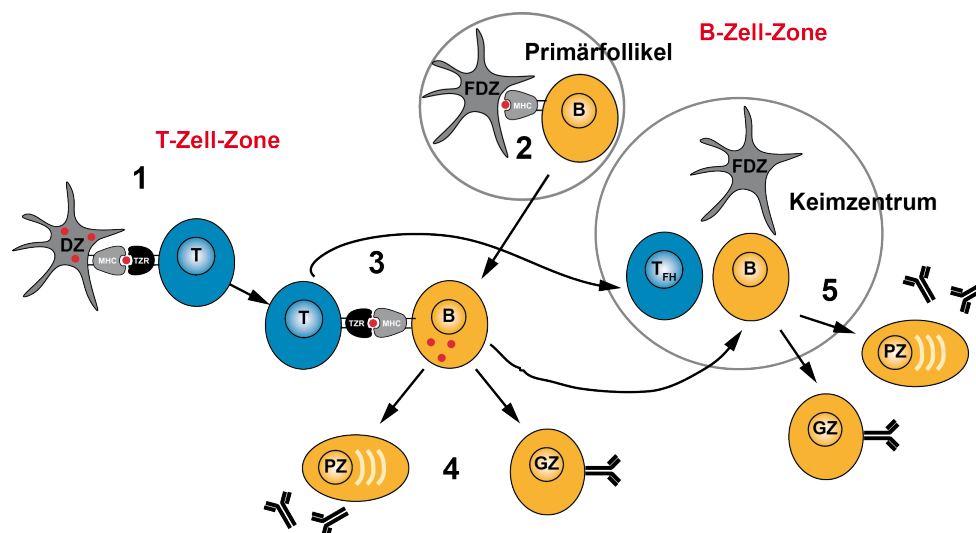
Die Möglichkeiten einer B-Zelle, direkte Effektorfunktionen auszuüben, sind im Vergleich zur T-Zelle eher begrenzt. So existieren zwar Berichte, die die Existenz verschiedener Zytokin-produzierender B-Zell-Subpopulationen proklamieren (Lund und Randall, 2010), welche physiologische Relevanz diese B-Zellen haben, ist jedoch noch nicht klar. Die wohl bedeutendste Eigenschaft einer B-Zelle, die sie von anderen Leukozyten unterscheidet, liegt in ihrer Fähigkeit, Antikörper verschiedener Affinität und Klasse zu exprimieren. Durch die Expression eines antigenspezifischen BZR sind diese Zellen in der Lage, spezifische Informationen eines Pathogens aufzunehmen und in Form löslicher Immunglobuline weiterzugeben. Somit steht die B-Zelle im Mittelpunkt der humoralen Immunantwort. Wie bereits an früherer Stelle erwähnt (siehe Abschnitt 1.1) benötigen B-Zellen die Hilfe von T-Zellen, um vollständig aktiviert zu werden. Anatomisch gesehen findet die T-B-Interaktion im sogenannten Keimzentrum statt (McHeyzer-Williams, 2001). B-Zellen des Keimzentrums durchlaufen eine Reihe wichtiger Modifikationen. Durch somatische Hypermutationsprozesse (SHM, *somatic hypermutation*) entstehen eine Reihe nah verwandter B-Zell-Klone, die sich in ihrer Spezifität und Affinität für das Antigen nur geringfügig unterscheiden (Weigert, 1970). In diesem Prozess werden Punktmutationen in die variable Region des BZR eingeführt, infolgedessen sich die Fähigkeit des BZR an das ursprüngliche Antigen zu binden, verändert. Follikuläre Dendritische Zellen (FDZ) spielen dabei eine besondere Rolle. Sie können Antigene in Form von Immunkomplexen über die Expression von Komplementrezeptoren (CD21 und CD35) und Fc-Rezeptoren binden und den B-Zellen präsentieren. Nur diejenigen B-Zellen, deren BZR infolge der Mutation eine stärkere Affinität zum Antigen besitzen, überleben (positive Selektion). B-Zellen mit verringerter Affinität zum Antigen gehen dagegen in Apoptose (negative Selektion) (Takahashi, 1999; Anderson, 2009). Es wird vermutet, dass sowohl die Signalgebung über den BZR, als auch die Konkurrenz um T-Zell-Hilfe (Victoria, 2010), die Prozesse der negativen und positiven Selektion im Keimzentrum steuern (Goodnow, 2010). Diese Mutations- und Selektionsprozesse führen dazu, dass sich die Affinität und Spezifität des BZR für ein gegebenes Antigen im Verlauf der T-Zell-abhängigen Immunreaktion kontinuierlich steigert (Affinitätsreifung; *affinity maturation*).

Neben der Affinitätsreifung führen B-Zellen zeitgleich auch einen Isotypwechsel (CSR; *class-switch recombination*) durch. Darunter versteht man den Klassenwechsel von einem IgM-Isotypen zu IgG, IgA oder IgE, der mit einer Änderung der Effektorfunktionen verbunden ist. Wie man heute weiß, kann der Klassenwechsel bereits schon vor dem Eintritt der B-Zellen in das Keimzentrum erfolgen (Jacob, 1991), was zeigt das SHM und CSR unabhängig voneinander ablaufen können (McHeyzer-Williams, 2012). Resultat der Keimzentrumsreaktion sind zum einen langlebige Plasmazellen, die das Keimzentrum verlassen, ins Knochenmark oder in Mukosa-assoziiertes, lymphoides Gewebe einwandern und dort für lange Zeit überleben, zum anderen B-Gedächtniszellen, die bei einem Zweitkontakt mit demselben Antigen sehr viel schneller und stärker reagieren als naive B-Zellen und sich infolgedessen zu Plasmazellen entwickeln, oder der Re-Population des Keimzentrums dienen (Manz, 1997; Slifka, 1998; Goodnow, 2010). Grundvoraussetzung für die Emigration aus dem Lymphknoten ist die Herunterregulation des Chemokinrezeptors CXCR5 und die Heraufregulation anderer gewebspezifischer Chemokinrezeptoren. Das Überleben der Plasmazellen im Knochenmark, aber auch im peripheren Gewebe ist von der Bereitstellung bestimmter Überlebensfaktoren abhängig. So konnte gezeigt werden, dass CXCL12, IL-6, BAFF (*B cell activating factor*) und APRIL (*a proliferation inducing ligand*) das Überleben von Plasmazellen fördern (Minges-Wols, 2002; Cassese, 2003). Gegenwärtig nimmt man an, dass B-Gedächtniszellen auch in Abwesenheit von persistierendem Antigen überleben können (Maruyama, 2000). Die Signale, die im Einzelnen dazu führen, dass sich eine Keimzentrums-B-Zelle zu einer Plasmazelle oder Gedächtniszelle entwickelt, sind bis heute nicht vollständig identifiziert. Man glaubt jedoch, dass die Affinität des BZR eine Rolle spielt und sich B-Zellen mit einer höheren Affinität zum Antigen bevorzugt zu Plasmazellen entwickeln (Smith, 1997; Phan, 2006).

Die Entscheidung einer B-Zelle zu einer Keimzentrums-B-Zelle zu werden, setzt die Expression des Mastertranskriptionsfaktors Bcl-6 voraus (Fukuda, 1997). Bcl-6 supprimiert dabei eine Vielzahl von Genen, die mit der B-Zell-Aktivierung, terminalen Differenzierung und Regulation des Zellzyklus in Verbindung stehen (Shaffer, 2000). Der Mastertranskriptionsfaktor für Plasmazellen dagegen ist Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*, Turner, 1994). Blimp-1 reguliert eine ganze Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die in ihrer Gesamtheit dafür verantwortlich sind, dass das für Plasmazellen spezifische Differenzierungsprogramm ablaufen kann. Plasmazellen sind enddifferenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen (Radbruch, 2006). Blimp-1 unterdrückt somit Gene, die für die Progression des Zellzyklus zuständig sind und die Signalgebung über den BZR regulieren (Shaffer, 2002). Außerdem werden Gene, die den Klassenwechsel ermöglichen, durch Blimp-1 supprimiert. Bcl-6 und Blimp-1 verhalten sich antagonistisch zueinander und regulieren sich wechselseitig. So kann Bcl-6 die Expression von Blimp-1 unterdrücken und damit die

Plasmazell-Differenzierung inhibieren (Reljic, 2000). Umgekehrt ist die Überexpression von Blimp-1 ausreichend, um die terminale Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen zu bewirken (Shaffer, 2002). Wie auch immer, die Differenzierung einer Keimzentrums-B-Zelle zu einer Plasmazelle oder B-Gedächtniszelle setzt die Herunterregulation von Bcl-6 voraus (Kuo, 2007; Shaffer, 2000), wobei die genauen Mechanismen, die dazu führen, nicht bekannt sind.

Plasmazellen und B-Gedächtniszellen können aber auch unabhängig von einer Keimzentrumsreaktion entstehen (Toyama, 2002; McLennan, 2003; Inamine, 2005). Man geht davon aus, dass diese Zellen dazu dienen, im Falle einer Infektion die erste, schnelle Abwehrfront zu bilden. Die entstandenen extrafollikulären Plasmazellen und B-Gedächtniszellen können zwar einen Klassenwechsel durchführen (Toellner, 1998), es wurde jedoch lange Zeit angenommen, dass sie nur kurzlebig sind und eine geringe Affinität zum Antigen besitzen (MacLennan, 2003). Anderen Berichten zufolge sind jedoch auch extrafollikuläre Plasmazellen in der Lage, eine Affinitätsreifung durchzuführen und ins Knochenmark einzuwandern (Matsumoto, 1996; Kato, 1998; Karrer, 2000). Die Signale, die die extrafollikuläre Plasmazellreaktion induzieren, sind nur unzureichend erforscht. Eine Beteiligung der BZR-Affinität wird aber auch diesem Prozess zugrunde gelegt (Paus, 2006). Neuere Berichte stärken die Rolle von T-Zellen in diesem Prozess und deuten daraufhin, dass sich die Qualität der T-Zell-Hilfe, die eine extrafollikuläre Antwort bewirkt, von der, die eine follikuläre Antwort induziert, unterscheidet (Lee, 2011). Die verschiedenen Schicksale, die eine B-Zelle nach ihrer Aktivierung haben kann, zeigt Abbildung 3.



**Abbildung 3. Differenzierung von B-Effektorzellen.**

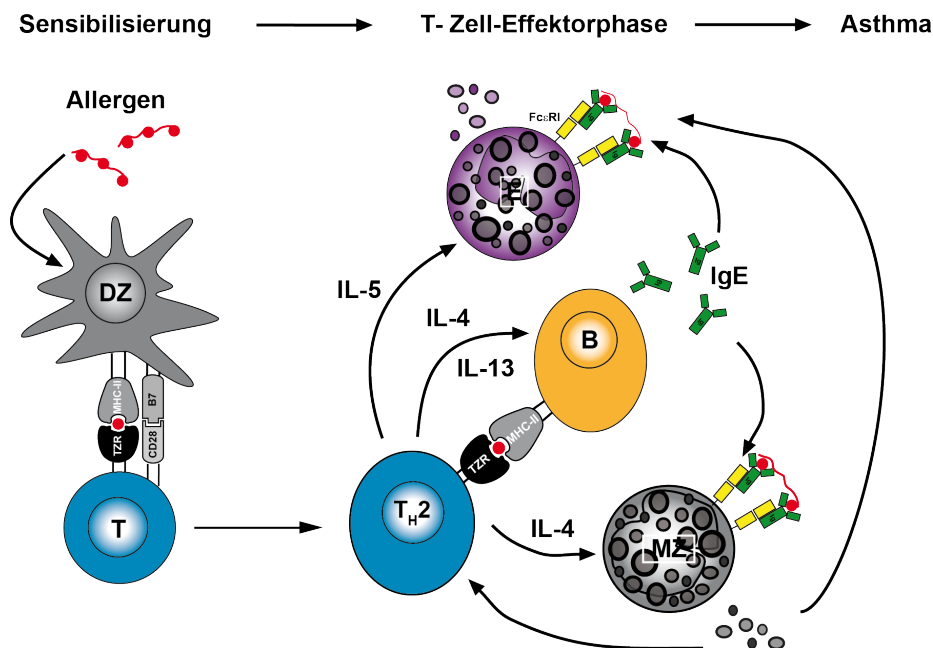
B-Zellen (B), die auf Follikulären Dendritischen Zellen (FDZ) ihr spezifisches Antigen über den B-Zell-Rezeptor (BZR) binden, werden aktiviert und wandern in Richtung T-Zell-Zone (2). An der Grenze zwischen T- und B-Zell-Zone treffen sie auf T-Zellen (T), die zuvor durch Dendritische Zellen (DZ) aktiviert worden sind, deren T-Zell-Rezeptor (TZR) eine Spezifität für das gleiche Antigen besitzt (1) und die daraufhin den Komplex aus MHC-II-Molekül und Antigenpeptid auf der

Oberfläche der B-Zellen erkennen (3). Die T-B-Interaktion führt zur vollständigen Aktivierung der B-Zellen, die infolgedessen sofort zu Plasmazellen (PZ) und B-Gedächtniszellen (GZ) werden (4), oder zurück ins B-Zell-Follikel wandern, eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen und erst dann das Keimzentrum als Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen verlassen (5).

## 1.5 Bedeutung der T- und B-Zellen für die asthmatische Reaktion

Der Respirationstrakt ist ständig mit einer Vielzahl von Umweltantigenen konfrontiert, die jedoch überwiegend tolerisiert werden und zu keiner Immunantwort führen. In asthmatischen Individuen allerdings führt das Einatmen eines Allergens zur krankmachenden Überreaktion (Holgate, 2008; Barnes, 2008). Allergene sind dabei harmlose Proteinantigene, die jedoch, bedingt durch eine genetische Prädisposition in Zusammenhang mit anderen Faktoren, in manchen Menschen eine krankmachende Immunreaktion auslösen. Die Sensibilisierung, d.h. der Erstkontakt mit dem Allergen und die daraufhin einsetzende Produktion von IgE, findet dabei häufig schon in der frühen Kindheit statt (Woodfolk, 2007). Dendritische Zellen, die im Lungengewebe ein Allergen aufgenommen und prozessiert haben, wandern in den Lymphknoten ein, in welchem sie naive T-Zellen den Komplex aus Peptid und MHC-II-Molekül präsentieren und daraufhin aktivieren (Abbildung 4). Die Differenzierung der T-Zellen zu  $T_H2$ -Effektorzellen stellt dabei eine wichtige Schlüsselkomponente der allergischen Reaktion dar und man geht davon aus, dass die Art des Antigens, die Präsenz mikrobieller Substanzen (z.B. Lipopolysaccharid), die Antigenroute und genetische Faktoren die Differenzierung zu  $T_H2$ -Zellen fördern. Die durch  $T_H2$ -Zellen freigesetzten Zytokine IL-4 und IL-13 bewirken in allergenspezifischen B-Zellen einen Klassenwechsel nach IgE. Das allergenspezifische IgE kann dann auf der Oberfläche von Mastzellen an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) binden, die dann durch die Bindung multivalenter Antigene quervernetzt werden und dadurch die Mastzellen aktivieren. Infolgedessen kommt es zur Freisetzung präformierter Mediatoren (z.B. Histamin), die die sogenannte Sofortreaktion verursachen. Diese äußert sich durch Vasodilatation, Konstriktion der glatten Bronchusmuskulatur und Verstärkung der Schleimsekretion. Darüber hinaus werden weitere Entzündungszellen wie  $T_H2$ -Effektorzellen und Eosinophile ins Lungengewebe rekrutiert, die dann die Spätphase der allergischen Reaktion dominieren. Diese ist durch eine andauernde Entzündungsreaktion und Bronchokonstriktion gekennzeichnet, die vor allem durch Eosinophile als Haupteffektorzellen verursacht werden. Eosinophile Granulozyten kommen in gesunden Menschen in nur geringen Frequenzen vor, in Allergikern dagegen sind sie in ihrer Zahl stark erhöht (Eosinophilie). Nach Aktivierung beginnen diese Zellen, die hochaffinen FcεRI zu exprimieren, die durch den erneuten Kontakt mit dem Allergen quervernetzt werden, was zur Degranulation der Eosinophilen führt (Lukacs, 2001). Ähnlich den Mastzellen können auch Eosinophile Mediatoren freisetzen, die sie entweder präformiert in ihren Granula speichern oder neu synthetisieren. Insgesamt unterscheidet man

vier verschiedene kationische Proteine, wobei das *major basic protein* (MBP) am stärksten gebildet wird. Die basischen Proteine sind hochtoxisch und verantwortlich für die Gewebszerstörung, die mit der asthmatischen Erkrankung einhergeht. Es kommt zu Strukturveränderungen in der Lunge (*airway remodelling*), einer Verengung der Luftwege und einhergehend damit zur Atemnot.



**Abbildung 4: Ablauf der allergischen Immunantwort.**

Eine Dendritische Zelle (DZ) patrouilliert durch den Körper, nimmt in der Lunge Antigene und damit Allergene auf und wird aktiviert. Nach Wanderung in den Lymphknoten erfolgt die Aktivierung naiver, allergenspezifischer T-Zellen (T), die sich infolgedessen zu T<sub>H</sub>2-Effektorzellen entwickeln. Die Freisetzung der T<sub>H</sub>2-Zytokine Interleukin-4 (IL-4), IL-5 und IL-13 bewirkt in allergenspezifischen B-Zellen (B) den Klassenwechsel nach Immunglobulin E (IgE). Die produzierten allergenspezifischen IgE-Antikörper können an hochaffine Fc-Epsilon-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen binden. Mastzellen setzen infolgedessen Mediatoren frei, die T<sub>H</sub>2-Effektorzellen und Eosinophile ins Entzündungsgebiet rekrutieren. Der erneute Kontakt mit dem Allergen führt zur Quervernetzung der FcεRI auf Eosinophilen, die die Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren aufrechterhalten. TZR T-Zell-Rezeptor; MHC-II Haupthistokompatibilitätskomplex-II (*major histocompatibility complex II*); ICOS induzierbarer Kostimulator (*inducible costimulator*); ICOS-L ICOS-Ligand

## 1.6 B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APZ)

B-Zellen bilden neben Dendritischen Zellen und Makrophagen die dritte Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen, obwohl ebenfalls auch eine Antigenpräsentation durch Eosinophile und Basophile diskutiert wird (Shi, 2004; Mikhak und Luster, 2009). Die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen ist zu Beginn einer Immunantwort unabdingbare Voraussetzung dafür, dass B-Zellen vollständig aktiviert werden und unerlässlich, um eine wirkungsvolle T-Zell-abhängige, humorale

Immunantwort zu induzieren (Baumjohann, 2011; Goenka, 2011). Mäuse, deren B-Zellen nicht in der Lage waren Antigen zu präsentieren, zeigten nur eine verminderte T-Zell-Antwort (Crawford, 2006). Die Rolle der B-Zellen als APZ wird jedoch besonders im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Erkrankungen diskutiert. Denn unter antigenlimitierenden Bedingungen haben B-Zellen einen Vorteil gegenüber Dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen wirksam zu werden (Rivera, 2001; Malynn, 1985; Townsend und Goodnow, 1998). Ursächlich dafür ist ihr antigenspezifischer B-Zell-Rezeptor, der es ihnen erlaubt, auch geringste Mengen an Antigen sehr effizient und hochspezifisch rezeptorvermittelt aufzunehmen. So gelingt es ihnen, geringe Mengen an Antigen zu konzentrieren und wirkungsvoll zu präsentieren. Dendritische Zellen dagegen besitzen keine Antigen-spezifität. Sie nehmen große Mengen lösliches Antigen über Makropinozytose und partikuläres Antigen über Phagozytose auf und können bestimmte Eigenschaften von Antigenen (Ladung, Glykosylierung) über unspezifische Rezeptoren erkennen und daran binden (Banchereau und Steinman, 1998). Die Affinität des BZR für ein gegebenes Antigen ist zu Beginn einer Immunantwort noch sehr gering, wird sich aber im Verlauf der Immunantwort zunehmend steigern (siehe Abschnitt 1.4). Nur diejenigen B-Zellen, deren BZR eine gesteigerte Affinität zum Antigen aufweisen, überleben und man weiß heute, dass eine positive Korrelation zwischen der BZR-Affinität und der antigenpräsentierenden Funktion der B-Zellen besteht (Batista und Neuberger, 1998). Im Gegensatz zu Dendritischen Zellen sind B-Zellen jedoch nicht in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren, da die notwendigen kostimulatorischen Moleküle erst nach Aktivierung der B-Zellen auf der Oberfläche hochreguliert werden.

## 1.7 Ausgangspunkt der Arbeit und Zielstellung

Nach der Identifizierung, Klonierung und funktionellen Charakterisierung des induzierbaren Kostimulators ICOS Ende der 90er Jahre, wurde in der Folgezeit eine Reihe von Publikationen veröffentlicht. Diese setzten sich zum Ziel, die Rolle von ICOS in unterschiedlichen Modellsystemen zu untersuchen. Um einer möglichen Funktion auf die Spur zu kommen, wurde initial durch den Einsatz blockierender Antikörper oder von Fusionsproteinen versucht, die Interaktion des ICOS/ICOS-L-Molekülpaars zu unterbinden (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999; McAdam, 2000). Erst die Generierung von ICOS KO (Dong, 2001; Özkaynak, 2001; Tafuri, 2001; McAdam, 2001) und später auch ICOS-L KO (Nurieva, 2003; Mak, 2003; Wong, 2003) Mäusen machte es jedoch möglich, Auswirkungen des fehlenden Rezeptors oder Liganden *in vivo* ausgiebig zu untersuchen. Initiale *in vitro* und *in vivo* Studien konnten zeigen, dass die Interaktion von ICOS mit ICOS-L eine kostimulatorische Wirkung auf T-Zellen ausübt, die unabhängig von CD28-CD80/86 erfolgt und bedingt durch die andauernde Expression von ICOS auf T-Gedächtniszellen, vermutlich nicht nur auf



die primäre, sondern auch sekundäre Immunantwort Einfluss nehmen kann (Yoshinaga, 1999; Hutloff, 1999). Spätere *in vivo* Untersuchungen in ICOS KO und ICOS-L KO Mäusen stärkten die Bedeutung dieser Interaktion für die Kooperation antigenspezifischer T- und B-Zellen (Dong, 2001; Tafuri, 2001; Wong, 2003). Schon frühzeitig konnte gezeigt werden, dass ICOS auf aktivierten T-Zellen, der Ligand dagegen auf einer Vielzahl von Zellen lymphoiden und nicht-lymphoiden Ursprungs exprimiert wird (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999; Ling, 2000; Wang, 2000; Aicher, 2000; Khayyamian, 2002). Aus diesem Umstand ergeben sich vielfältige Interaktionsmöglichkeiten für ICOS-exprimierende T-Zellen und eine Interaktion über ICOS kann sowohl mit Dendritischen Zellen als auch mit B-Zellen erfolgen. Untersuchungen in Mäusen, die durch das vollständige Fehlen des Rezeptors oder Liganden gekennzeichnet sind, geben zwar einen Hinweis auf die globale Bedeutung der ICOS-Kostimulation im Immunsystem, können die beobachteten Effekte jedoch nicht auf die fehlende Kostimulation zwischen bestimmten Interaktionspartnern zurückführen. Trotzdem wurde nur von wenigen Gruppen der Versuch unternommen, die Relevanz der ICOS-Signalgebung zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen von der zwischen T-Zellen und B-Zellen abzugrenzen (Mak, 2003; Nurieva, 2008). Beobachtungen unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass nur der Transfer ICOS<sup>+</sup> T-Zellen, nicht aber ICOS<sup>-</sup> T-Zellen in einem murinen Atemwegsinflamationsmodell zu einer Akkumulation von B-Zellen im Lungengewebe führte (Löhning, 2003; Beier, 2004).

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war daher:

1. Ein neuartiges Atemwegsinflamationsmodell in der Maus zu etablieren, das:
  - im Hinblick auf das verwendete Adjuvanz und den Eintrittsweg des Antigens möglichst physiologisch ist,
  - und es erlaubt, antigenspezifische T- und vor allem B-Zellen im entzündeten Gewebe aber auch drainierenden Lymphknoten zu analysieren.
2. Ein System zu entwickeln, das es ermöglicht, die Relevanz der ICOS-Signalgebung in der Interaktion von T- und B-Zellen, sowie T-Zellen und Dendritischen Zellen isoliert zu betrachten.
3. Zu analysieren, welche Relevanz B-Zellen für den Fortgang einer Immunantwort im entzündeten Gewebe haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Softwareprogramme

Gerät/Zubehör	Software	Hersteller
Mikroskop: Axioskop 2, Axiocam, Objektive: Plan-Neofluar 5X; Plan-Apochromat Deutschland 10x/0,45; 20X/0,8; 100x/1,4 oil	AxioVision 4.7	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena,
Durchflusszytometer: LSR II	BD FACSDiva	BD Biosciences
Durchflusszytometer: FACSAria™ II cell sorter Cytospin® 3	BD FACSDiva	BD Biosciences  Shandon Scientific LTD, England
Mikrotiterplatten-Waschgerät: 96 Plate Washer™ (ELISA) gentleMACS™ Dissociator		Tecan Austria GmbH, Grödig/ Salzburg, Österreich  Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Zellzählgerät: Guava® PCA	Guava ViaCount® Assay	Guava Technologies, Hayward, CA, USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät: Infinite M200 PRO	Magellan 7.1	Tecan Austria GmbH, Grödig/ Salzburg, Österreich
Kryostat: Leica CM1950		Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland

### 2.2 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Verbrauchsmaterialien:	Bezugsquelle:
Cell Trics® Disposable Filter (30 µm)	PARTEC, Görlitz, Deutschland
Cellstar® Tubes (50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen (24 x 50 mm)	Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Feuchtekammer (300 × 200 × 50 mm)	Werkstätte f. Chemie und Photo, Berlin, Deutschland
gentleMACS™ Tubes (C Tubes)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Glaskapillaren (10 µm)	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
ImmEdge Pen (Wachsstift)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Insulinspritzen (1 ml)	TERUMO®, Leuven, Belgien
MACS® Separation Columns (LS Columns); Multi Stand	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch MACS Gladbach, Deutschland
Metallsieb 212 µm	Werkstätte f. Chemie und Photo, Berlin, Deutschland
Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Rund- und Flachboden)	Nunc, Dänemark
Objektträger (gebrauchsfertig, geschnitten)	Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Venenverweilkanüle BD Neoflon™	BD Biosciences
Venenpunktionsbesteck (Venofix®)	Braun, Melsungem, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb 70 µm	BD Falcon™, MA, USA
Zentrifugenröhrchen 14 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
<b>Reagenzien:</b>	<b>Bezugsquelle:</b>
Aceton	Carl Roth GmbH + Ko.KG, Karlsruhe, Deutschland
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
10X Casein Solution	Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA
Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)	Life Technologies (Molecular Probes), Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diff-Quick® Schnellfärbeset	Medion Diagnostics AG, Düdingen, Schweiz
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase I	Roche Diagnostics, IN, USA
Ethanol ≥ 99,8 %, vergällt mit ca. 1 % MEK	Carl Roth GmbH + Ko.KG, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein, Deutschland

FoxP3 Fixierungs-/Permeabilisierungsset (Concentrate, Diluent, 10X Permeabilization buffer)	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glukoseoxidase aus <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
rekombinantes, murines Interleukin-4 (IL-4)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isofluran	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Methylbutan)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kalialaun [ $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ]	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaisers Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase D aus <i>clostridium histolyticum</i>	Roche Diagnostics, IN, USA
LDS 751	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>E. coli</i> O55:B5	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Live/Dead® Fixable Stain Kit	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (Research Grade)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumiodat ( $\text{NaIO}_3$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA 100X)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
4-Hydroxy-5-Nitrophenylacetic acid Succinimide ester (NP-OSu)	Biosearch Technologies, Novato, CA, USA
Ovalbumin (Albumin from Chicken white egg, Grade V)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
OVA <sub>323-339</sub> (ISQAVHAAHAEINEAGR)	synthetisiert von P. Henklein, Charité, Berlin
Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbeset	Carl Roth GmbH + Ko.KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Peanut Agglutinin (PNA)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Ratten-Immunglobulin (unkonjugiert)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA

Rinder-Serumalbumin (BSA; low Endotoxin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Rinderserumalbumin (BSA, POD-frei)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom GmbH & Co., Berlin
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T Compound	Sciences Services, München, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 2.3 Puffer, Lösungen und Medien

AEC-Stammlösung	1 Tablette AEC 2,5 ml Dimethylformamid
AEC-Substratlösung (Histologie)	50 mM Natriumacetat 5 % (v/v) AEC-Stammlösung in dH <sub>2</sub> O, pH 5,0
Antikörper-PBS (AK-PBS)	0,2 % (v/v) BSA 0,1 % (v/v) NaN <sub>3</sub> -Stammlösung in PBS
0,5X Casein	5 % (v/v) Casein in dH <sub>2</sub> O
DAPI-Stammlösung (LSR II)	14,3 mM DAPI in DMSO
DAPI-Stammlösung (FACS Aria II)	25 µM DAPI in NaCl
Erylyselösung	0,15 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O, pH 7.2-7,4
ELISA-Blockierungslösung	1 % (v/v) BSA (POD-frei) 0,1 % Tween® 20 in PBS
ELISA-Waschpuffer	0,1 % (v/v) Tween® 20, in PBS, pH 7,3
FACS-PBS	2,5 % (v/v) FCS 0,1 % (v/v) NaN <sub>3</sub> -Stammlösung in PBS
10X Fc-Block	1 mg/ml Anti-CD16/32 (2.4G2) 0,5 mg/ml Ratten-Immunglobulin in PBS

4%ige Formaldehydlösung	37%ige Formaldehydlösung in PBS
Hämatoxylin-Lösung (nach Mayers)	3,1 mM Hämatoxylin Monohydrat 1 mM NaIO <sub>3</sub> 105 mM Kalialaun 302 mM Chloralhydrat 4,7 mM Zitronensäure in dH <sub>2</sub> O
Histologie-Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween® 20 in PBS
Ladepuffer (CFSE)	0,1 % (v/v) BSA in PBS
MACS-PBS	0,5 % (v/v) BSA in PBS
Narkoselösung (pro Tier)	1,5 mg Ketamin 0,08 mg Xylazin in PBS
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )-Stammlösung (20 %)	200 mg NaN <sub>3</sub> 1 ml PBS
Phospat-gepufferte Salzlösung (PBS)	136,89 mM NaCl 2,68 mM KCl 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,05 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,3
Peroxidase-Blockierungslösung (Histologie)	10 mM Glukose 1 U/ml Glukoseoxidase 1 mM Natriumazid in PBS
R10F <sup>+</sup> Medium	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 50 µM β-Mercaptoethanol
0,5 M Phospat-Citrat-Puffer (ELISA)	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 M Zitronensäure in dH <sub>2</sub> O, pH 5,0
Saponinpuffer	5 % (w/v) Saponin in FACS-PBS
Silanisierungslösung	2 % (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan in Ethanol
50 % Tissue-Tek	Tissue-Tek in PBS
TMB-Substratlösung (ELISA)	1 Tablette TMB 10 ml 0,05 M Phospat-Citrat-Puffer
Verdaupuffer	RPMI 1640 0,5 % (v/v) BSA

Zellkulturmedium	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren 1 % (v/v) Natriumpyruvat 50 µM β-Mercaptoethanol
Zellzählösung	2,5 µg/ml LDS-751 1 µg/ml Propidiumjodid 5 mM EDTA 0,05 % (v/v) NaN <sub>3</sub> in PBS

## 2.4 Monoklonale Antikörper (mAK)

**Tabelle 1. Verwendete monoklonale Antikörper.**

Die Tabelle zeigt sämtliche in dieser Arbeit verwendeten, monoklonalen Antikörper, wobei einige kommerziell bezogen, andere aus eigenen Hybridomüberständen gewonnen wurden. Nicht kommerzielle Antikörper wurden, wenn notwendig, an verschiedene Fluorophore gekoppelt. Antikörper, die in der Histologie eingesetzt wurden, sind *kursiv* geschrieben. Solche, die im ELISA verwendet wurden, sind **fett** markiert. ATCC *American Type Culture Collection*; ECACC *European Collection of Cell Cultures*

<b>Antigenspezifität</b>	<b>Klonbezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Referenz/Hersteller</b>
<i>Dig (Fab)</i>		<i>kommerziell</i>	<i>Roche Diagnostics, IN, USA</i>
<i>FITC (Fab)</i>		<i>kommerziell</i>	<i>Roche Diagnostics, IN, USA</i>
Bcl-6	K112-91	kommerziell	BD Biosciences
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari, 1988
CD4	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC: 87072282
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11c	N418	Hybridom	ATCC: HB-224
CD19	1D3	Hybridom	ATCC: HB-305
CD19	6D5	kommerziell	BioLegend
CD21/35	7G6	kommerziell	BD Biosciences
<i>CD21/35</i>	<i>7G6</i>	<i>kommerziell</i>	<i>BD Biosciences</i>
CD23	B3B4	kommerziell	BD Biosciences
CD25	2E4	Hybridom	Ortega, 1984
CD38	90	kommerziell	eBiosciences/BioLegend
CD45.1	A20	kommerziell	eBiosciences/BioLegend
<i>CD45.1</i>	A20	<i>kommerziell</i>	<i>eBiosciences/BioLegend</i>
CD45.2	104	kommerziell	eBiosciences/BioLegend
CD45R (B220)	RA3-6B2	kommerziell	Coffman, 1983
CD62L	MEL-14	Hybridom	ATCC: HB-132
CD69	H1.2F3	kommerziell	eBiosciences/BioLegend
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
<i>CD90.1 (Thy-1.1)</i>	<i>OX-7</i>	<i>Hybridom</i>	<i>ECACC: 84112008</i>

CD134 (OX-40)	OX-86	Hybridom	ECACC: 96110601
CD138	281.2	kommerziell	BD Biosciences
<i>CD138</i>	<i>281.2</i>	<i>kommerziell</i>	<i>BD Biosciences</i>
CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	kommerziell	BioLegend
CD185 (CXCR5)	2G8	kommerziell	BD Biosciences
CD275 (ICOS-L)	MIL-5733	Hybridom	Frey, 2010
CD278 (ICOS)	MIC-280	Hybridom	Löhning, 2003
CD279 (PD-1)	J43	kommerziell	eBiosciences
GATA-3	TWAJ	kommerziell	eBiosciences
GC B cells	GL7	Hybridom	Laszlo, 1993
IgA	C10-3	kommerziell	BD Biosciences
IgD	11-26c	Hybridom	ATCC: HB-250
IgE	R35-72	kommerziell	BD Biosciences
<b>IgE</b>	<b>R35-72</b>	<b>kommerziell</b>	<b>BD Biosciences</b>
IgG1	LO-MG 1-2	kommerziell	Serotec
IgM	Bet-2	Hybridom	ATCC: HB-88
<b>IL-2</b>	<b>JES6-1A12</b>	<b>kommerziell</b>	<b>Biosource International</b>
<b>IL-2</b>	<b>JES6-5H4</b>	<b>Hybridom</b>	Abrams, 1992
IL-4	BVD6-24G2	kommerziell	eBiosciences
IL-10	JES5-2A5	Hybridom	Sander, 1993
IL-13	38213.11	kommerziell	R&D Systems
IFN- $\gamma$	AN18.17.24	Hybridom	Prat, 1984
Ly-6G/C	RB6-8C5	Hybridom	Hestdal, 1991
<i>MBP-1</i>	MBP-1	James Lee, Scottsdale	
MHC-II	M5/114.15.2	Hybridom	ATCC: TIB-120
NP-spez. BZR	Ac146	Hybridom	Reth, 1979
Siglec-F	E50-2440	kommerziell	BD Biosciences
TIGIT	GIGD7	kommerziell	eBiosciences
V $\alpha$ 2-TCR	B20.1	kommerziell	eBiosciences
V $\beta$ 5-TCR	MR9-4	kommerziell	BD Biosciences

## 2.5 Tierexperimentelle Methoden

### 2.5.1 Mäuse

C57BL/6 Mäuse und BALB/cAnNCrI (Gorham, 1996) Mäuse wurden in der Tieranlage des Bundesinstituts für Risikobewertung gezüchtet. Des Weiteren erfolgte eine Rückkreuzung von ICOS Knock-out (KO) (Özkaynak, 2001) und ICOS-L KO Mäusen (Wong, 2003) für zehn Generationen auf C57BL/6 und BALB/c. Die Kreuzung von Ovalbumin (OVA) T-Zell-Rezeptor (TZR)-transgenen OT-II Mäusen (Barnden, 1998) mit B6.PL Mäusen (Jackson Laboratories) führte zur Einkreuzung des kongenen Markers CD90.1 (Thy-1.1), der es ermöglichte, OVA-spezifische T-Zellen *in vivo* zu verfolgen. Eine weitere Kreuzung dieser Mäuse mit ICOS KO Tieren brachte die OT-II ICOS KO Mäuse hervor. Nitrophenol (NP) B-Zell-Rezeptor (BZR)-transgene B1-8i Mäuse (Sonoda, 1997)



wurden zusätzlich mit CkT Tieren (Zou, 1993) verpaart. Als kongener Marker für die NP-spezifischen B-Zellen diente CD45.1, der durch Kreuzung der B1-8i CkT Tiere mit Ly-5.1 Mäusen (Jackson Laboratories) eingeführt wurde. Die weiterführende Verpaarung mit ICOS-L KO Mäusen brachte die B1-8i ICOS-L KO Tiere hervor.

Für alle Experimente wurden weibliche, altersgleiche Spender- und Empfängertiere verwendet, die zwischen 8-12 Wochen alt waren. Die Zucht der Tiere erfolgte unter spezifisch pathogen-freien (SPF) Bedingungen im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin, wobei die Durchführung der Experimente in der Tierhaltungsanlage des Robert Koch-Instituts (RKI) erfolgte. Alle Experimente wurden gemäß den staatlichen Richtlinien durchgeführt und waren durch die lokale Genehmigungsbehörde bescheinigt.

### 2.5.2 Adoptiver Transfer

Als Spendertiere für die OVA-TZR-transgenen T-Zellen dienten OT-II und OT-II ICOS KO Mäuse. NP-spezifische B-Zellen wurden aus B1-8i und B1-8i ICOS-L KO Mäusen isoliert.  $2-2,5 \times 10^6$  OVA-TZR-transgene ( $V\alpha 2\text{-TZR}^+ V\beta 5\text{-TZR}^+$ ) T-Zellen und  $2-2,5 \times 10^6$  folliculäre ( $CD21^+ CD23^+$ ), NP-BZR-transgene B-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvene syngener Empfängermäuse injiziert. Die T-Zellen wurden zuvor entweder über magnetische Zellsortierung (siehe 2.6.2) auf  $CD62L^{\text{hoch}}$  exprimierende und damit naive T-Zellen angereichert oder *in vitro* in Richtung eines  $T_H2$ -Helfer-Zelltyps polarisiert (siehe 2.6.7). Für einige Experimente wurden auch die B-Zellen sortiert, indem  $CD43^+$  Zellen aus B1-8i oder B1-8i ICOS-L KO Splenozyten über magnetische Zellsortierung abgereichert wurden (siehe 2.6.2). In der Durchflusszytometrie war es dann möglich, die antigenspezifischen T- und B-Zellen über die kongenen Marker CD90.1 (Thy-1.1) bzw. CD45.1 von endogenen Zellen zu unterscheiden (siehe Abbildung 6).

### 2.5.3 Immunisierung der Tiere

#### 2.5.3.1 Herstellung des Nitrophenol-Ovalbumin (NP-OVA)-Konjugats

100 mg Ovalbumin-Protein wurden in 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$ -Puffer gelöst und 150 mg Nitrophenol-Succinimidylester (NP-OSu) unter Rühren zugegeben. Die Dialyse der Lösung gegen PBS diente dazu, freies Nitrophenol zu entfernen (MWCO 12 400). Der Wechsel des Puffers erfolgte nach zwei, vier und 24 h. Anschließend wurden das Volumen und damit die Konzentration der NP-OVA-Lösung bestimmt. Geeignete Aliquots an NP-OVA wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

### 2.5.3.2 Kopplung von NP-OVA an ALUM (Aluminiumhydroxid)

10 ml der Ovalbumin-Proteinlösung (5 mg/ml) wurden mit 12,5 ml 9%iger Kalialaunlösung unter Rühren vereinigt. Anschließend wurden 500 µl NaOH-Lösung tropfenweise zugefügt, um einen pH-Wert zwischen pH 6,0-7,5 zu erhalten. Nach einer weiteren Stunde unter Rühren, erfolgten zwei Waschschritte mit PBS (2000 x g, 5 Min., 4 °C). Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und in geeigneten Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mittels Coomassie-Test.

### 2.5.3.3 Intranasale Antigengabe

Für alle adoptiven Transferexperimente wurden 5-50 µg lösliches NP-OVA-Konjugat zusammen mit 2-5 µg Lipopolysaccharid (LPS) als Adjuvanz mindestens zwei Mal und höchstens vier Mal intranasal (i. n.) verabreicht (Abbildung 6 und Abbildung 11A). Im Falle der aktiven Sensibilisierung erfolgte zunächst die systemische Immunisierung über die intraperitoneale (i. p.) Gabe von 50 µg NP-OVA/ALUM. Anschließend wurden 50 µg lösliches NP-OVA intranasal verabreicht, um die lokale Immunantwort zu stimulieren (Abbildung 11A).

Die intranasale Antigengabe setzte die Narkotisierung der Mäuse voraus. Dazu erfolgte eine Injektionsanästhesie mit Ketamin und Xylazin in PBS, wobei 100 µl der Narkoselösung pro Tier (pro 20 g Maus: 1,5 mg Ketamin + 0,08 mg Xylazin) i. p. verabreicht wurden.

## 2.6 Zellbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolierung muriner Zellen

#### 2.6.1.1 Isolierung von Zellen aus der Milz

Nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation wurde die Milz entnommen, von Fett frei präpariert, in drei Teile geschnitten und durch ein 212 µm Sieb passiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde nachfolgend durch ein 70 µm Nylonsieb filtriert und 8 Min. bei 380 x g und 20 °C zentrifugiert. Zur Lyse der Erythrozyten, die während der durchflusszytometrischen Analyse störend wirken können, erfolgte die Resuspension des Zellpellets in einem Erylysepuffer für 1 Min. bei RT. Die Erylyse wurde durch Zugabe von PBS abgestoppt und die Zellen erneut durch ein 70 µm Zellsieb filtriert. Anschließend wurden die Zellen gezählt (siehe 2.6.3), 8 Min. bei 380 x g und 4 °C zentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen R10F<sup>+</sup>-Medium resuspendiert.

### 2.6.1.2 Isolierung von Zellen aus der Lunge

Die Lunge wurde zuerst über die rechte Herzkammer mit 10 ml PBS unter Verwendung des Venenpunktionsbestecks und einer 10 ml Spritze gespült und danach entnommen. Die Perfusion diente dazu, alle Erythrozyten weitestgehend aus der Lunge zu entfernen. Thymus, Fett- und Bindegewebe wurden unter dem Binokular ebenfalls entfernt, genauso wie der tracheobroncheale Lymphknoten. Das Lungengewebe wurde unter Nutzung des gentleMACS™ Dissociators zerkleinert. Die Zerkleinerung erfolgte in C Tubes in RPMI/BSA-Verdaupuffer unter Verwendung des voreingespeicherten Lungenprogramms lung\_01-01. Nach einer kurzen Zentrifugation der Röhrchen für 3 Min. bei 380 x g und 4 °C schloss sich ein Gewebeverdau an. Dazu wurden dem Ansatz 500 µg/ml Kollagenase D und 20 µg/ml DNase I zugegeben. Der Gewebeverdau erfolgte in einem Schüttelwasserbad für 30 Min. bei 37 °C. Durch Zugabe von 60 µl 0,5 M EDTA (Endkonzentration: 10 mM) für die letzten 5 Min. wurde die Kollagenase inhibiert und der Verdau gestoppt. Ein weiterer Gewebezerkleinerungsschritt folgte (gentleMACS™ Dissociator; Programm lung\_01\_02). Anschließend wurden die C Tubes zentrifugiert (8 Min., 380 x g, 4 °C), die Zellsuspension durch ein 70 µm Nylonsieb filtriert und nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (8 Min., 380 x g, 4 °C) eine Erylyse durchgeführt (siehe 2.6.1.1). Nach erneuter Filtration der Zellsuspension konnten die Zellen gezählt (siehe 2.6.3) werden.

### 2.6.1.3 Isolierung von Zellen aus dem Lymphknoten

Zellen wurden hauptsächlich aus dem tracheobronchealen Lymphknoten (drainierenden Lymphknoten für die Lunge) isoliert. Er befindet sich an der Gabelung der Hauptbronchi und muss unter dem Binokular frei präpariert werden. Die Einzelzellsuspension wurde durch grobes Zerzupfen des Gewebes mit anschließender Passage durch ein 70 µm Nylonzellsieb erhalten. Lymphknotenzellen wurden in R10F<sup>+</sup>-Medium resuspendiert und gezählt.

## 2.6.2 Magnetische Zellsortierung (MACS®)

Die Separation von Zellen erfolgte unter Verwendung der MACS® Technologie (Miltenyi, 1990). Dabei wurden die Zellen durch die Inkubation mit superparamagnetischen Partikeln, die an spezifische Antikörper gebunden waren (*Beads*), markiert und über magnetisierbare Säulen von anderen Zellen abgetrennt. Die magnetische Sortierung der Zellen erfolgte als positive oder negative Sortierung, indem die Zielzellen entweder auf der Säule zurückgehalten wurden (positiv) oder sich im Durchlauf befanden (negativ). Die Zellen wurden zunächst in einer Konzentration von 2-3 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml in MACS-PBS/Fc-Block aufgenommen und 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe der *Beads* und die weitere Inkubation der Zellen für 15 Min. bei 4 °C. Im Falle der indirekten

magnetischen Markierung wurden die Zellen zunächst mit einem biotinylierten, gegen die Zielstruktur gerichteten, monoklonalen Antikörper inkubiert (15 Min., 4 °C) und erst anschließend gegen Biotin gerichtete *Beads* zugegeben. Nicht gebundene Antikörper/*Beads* konnten durch nachfolgendes Waschen mit einem zehnfachen Überschuss an MACS-PBS entfernt werden (380 x g, 8 Min., 4 °C). Zur Separation der Zellen dienten LS-Säulen.

Die Anreicherung von naiven, CD62L<sup>hoch</sup> exprimierenden T-Zellen, sowie von CD45.1<sup>+</sup> BZR-transgenen B-Zellen aus komplexen Zellsuspensionen erfolgte als Positivsortierung über die direkte (anti-CD62L-*Beads*) und indirekte (biotinylierter anti-CD45.1 mAK + anti-Biotin-*Beads*) magnetische Markierung. Die Abreicherung von CD43<sup>+</sup> Leukozyten wurde durch negative Sortierung und die Verwendung von anti-CD43-*Beads* erreicht. Alle verwendeten *Beads* wurden von der Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland) bezogen und der Erfolg der Zellsortierung und die Frequenz der Zielzellen mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

### 2.6.3 Zellzählung

Das Zellzählgerät Guava® PCA zusammen mit der Guava ViaCount® Assay Software dienten dazu, die Zellzahl zu bestimmen. Dazu mussten die Zellen in Zellzählösung verdünnt werden. Gezählt wurden lebende, kernhaltige Zellen. Der erhaltene Wert diente als Berechnungsgrundlage für die absoluten Zellzahlwerte verschiedener Zellpopulationen.

### 2.6.4 Analyse der Zytokinproduktion

Lymphknoten- und Lungenzellen wurden in Zellkulturmedium resuspendiert und in einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) für 4,5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alternativ erfolgte die Inkubation selbiger Zellen mit OVA<sub>323-339</sub>-Peptid (10 µg/ml) in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml. Die *in vitro* Restimulation wurde in Rundbodenmikrotiterplatten (96 Vertiefungen a' 250 µl) durchgeführt. Um Zytokine intrazellulär anfärben zu können, erfolgte der Zusatz von 5 µg/ml Brefeldin A (Bref A) für die letzten 3 h der Inkubation. Zur Messung von Zytokinen im Zellkulturüberstand, wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml mit OVA<sub>323-339</sub>-Peptid (10 µg/ml) und ohne den Zusatz von Bref A für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die intrazelluläre Färbung mussten die Zellen nach Ablauf der Zeit fixiert und permeabilisiert werden (siehe 2.6.5.2). Andernfalls wurden die Zellen zentrifugiert (400 x g, 5 Min., 4 °C) und der Zellkulturüberstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Bis zur Detektion der Zytokine mittels ELISA (siehe 2.8) erfolgte die Lagerung des Überstandes bei -20 °C.

## 2.6.5 Durchflusszytometrie

### 2.6.5.1 Markierung von Zelloberflächenproteinen

Durchflusszytometrische Analysen wurden unter Nutzung des Mehrfarbendurchflusszytometers BD™ LSR II und der BD FACSDiva Software der Fa. Becton Dickinson durchgeführt. Dies ermöglichte die parallele Analyse mehrerer Oberflächenproteine auf Einzelzellebene. Die Zellen wurden dabei in einer Zelldichte von  $5-7 \times 10^7$  Zellen/ml, in einem Gesamtvolumen von 50-100  $\mu$ l, in Rundbodenmikrotiterplatten (96 Vertiefungen a' 250  $\mu$ l) gefärbt. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper an Fc-Rezeptoren zu unterbinden, erfolgte vor der eigentlichen Färbung eine Inkubation der Zellen in 1X Fc-Block für 5 Min. auf Eis. Anschließend wurde ein Mix aus verschiedenen Antikörpern (AK) zugegeben (20 Min. auf Eis), die in AK-PBS vorverdünnt waren. Die verwendeten Antikörper waren monoklonal und entweder direkt an einem Fluorophor gekoppelt oder mit Biotin oder Digoxigenin haptensiert (Tabelle 1). Haptensierte Antikörper mussten zusätzlich durch einen zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper (Strep-Fluorophor; anti-Dig-Fluorophor) nachgewiesen werden (5-10 Min. auf Eis). Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen der Zellen mit FACS-PBS entfernt (5 Min., 400 x g, 4 °C), die Zellen anschließend in FACS-PBS aufgenommen und zur Diskriminierung toter Zellen mit 0,33  $\mu$ M 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) versetzt. Alle verwendeten Antikörper wurden zuvor auf ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis titriert.

### 2.6.5.2 Darstellung von intrazellulären Proteinen

Für die Darstellung intrazellulärer Proteine war es notwendig, die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren. Die intrazelluläre Färbung folgte nach der Oberflächenfärbung (siehe 2.6.5.1). Um tote Zellen diskriminieren zu können, erfolgte vor der Fixierung und nach der Oberflächenfärbung die Inkubation der Zellen in 200  $\mu$ l 1,34  $\mu$ M Pacific Orange für 25 Min. auf Eis. Zur Fixierung wurden die oberflächengefärbten Zellen in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert und mit 100  $\mu$ l 4%iger Formaldehydlösung versetzt (20 Min, RT). Die Permeabilisierung der Zellen wurde durch Waschen der Zellen mit einem Saponinpuffer (5 Min., 400 x g, 4 °C) erreicht. Analog zur Oberflächenfärbung konnte die unspezifische Bindung der Antikörper durch die Präinkubation der Zellen in 1X Fc-Block für 5 Min. auf Eis verhindert werden. Die Färbung der intrazellulären Proteine erfolgte für 30 Min. bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit Saponinpuffer gewaschen (5 Min., 400 x g, RT) und in FACS-PBS aufgenommen.

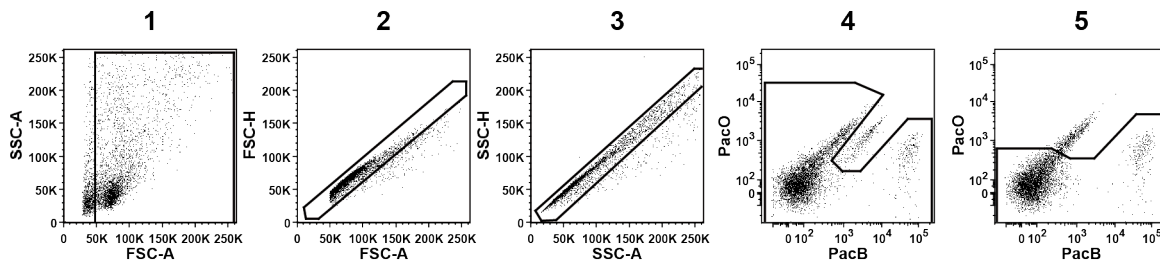
Für die intrazelluläre Färbung von Transkriptionsfaktoren wurde zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen das kommerzielle FoxP3 Fixierungs- und Permeabilisierungspufferset von eBiosciences verwendet. In diesem Fall erfolgte die Fixierung der Zellen für 1 h bei 4 °C.

### *2.6.5.3 Messung der Zellproliferation mittels CFSE*

Die Proliferation der Zellen wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung des Farbstoffs 5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) analysiert. Dazu wurden die Zellen in einer Zelldichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in einer  $5 \mu\text{M}$  CFSE-Lösung (verdünnt in PBS/BSA-Ladepuffer) resuspendiert und für 10 Min. in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der sich anschließende Waschschrift mit einem zehnfachen Überschuss an Ladepuffer diente dazu, unkonjugierten CFSE zu entfernen. Nach Eintritt in die Zelle wird der leicht membrangängige 5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester durch intrazelluläre Esterasen in den weniger membrangängigen 5, 6-Carboxyfluorescein Succinimidylester umgewandelt und damit in der Zelle festgehalten. Erst durch Abspaltung der zwei Acetatgruppen erhält der Ester seine fluoreszierenden Eigenschaften. Während der Zellteilung kommt es zu einer gleichmäßigen Weitergabe des Farbstoffs an die Tochterzellen, wodurch sich das CFSE-Signal mit jeder Zellteilung ausverdünnert (Lyons und Parish, 1994). Anhand der Stärke des Signals können bis zu sieben Proliferationszyklen analysiert werden. Zur Analyse der Zellen wurde das Durchflusszytometer LSR II von Becton Dickinson genutzt.

### *2.6.5.4 Analyse der durchflusszytometrischen Daten*

Die erhaltenen durchflusszytometrischen Daten wurden mit Hilfe der Analysesoftware Flowjo (Tree Star Inc.) für Macintosh ausgewertet. Die Darstellung der erhaltenen Daten erfolgte als Dot Plot oder als Histogramm. Wenn nicht anders angezeigt, repräsentiert die Zahl innerhalb des Diagramms die Frequenz der dargestellten Zellpopulation (bezogen auf die Elternpopulation). Die grundlegende Vorgehensweise zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten ist in Abbildung 5 dargestellt. Diese Schritte wurden für jede Analyse durchgeführt.



**Abbildung 5. Analyse der durchflusszytometrischen Daten.**

Gezeigt ist die grundlegende Vorgehensweise bei der Analyse durchflusszytometrischer Daten. Die gemessenen Zellen werden gemäß ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) eingegrenzt, Zelltrümmer werden ausgeschlossen (1). Dubletten, erkennbar an einem disproportionierten Verhältnis von FSC bzw. SSC-Fläche zu -Höhe (2, 3) und DAPI<sup>+</sup>, tote Zellen (4) werden ausgegrenzt. Zusätzlich müssen autofluoreszente Zellen aus der Analyse entfernt werden (5). SSC *sideward scatter*, FSC *forward scatter*, A *area*, H *height*, PacO *Pacific Orange*, PacB *Pacific Blue*.

## 2.6.6 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Um kleine Zellpopulationen in hoher Reinheit isolieren zu können, wurde das FACS (*fluorescence-activated cell sorter*)-System verwendet. In Abhängigkeit von der Startfrequenz der Zielzellen war teilweise eine Voranreicherung über magnetische Zellsortierung notwendig (siehe 2.6.2). Transgene, NP-spezifische B-Zellen wurden aus der Lunge und dem Lymphknoten von C57BL/6 Empfängermausen über CD45.1 zunächst magnetisch sortiert (siehe 2.6.2) und anschließend unter Verwendung folgender Antikörper fluoreszenzmarkiert: anti-CD45.1-Bio/Strep-PE-Cy7, anti-CD45.2-A700 und anti-CD19-APC-Cy7. Transgene, OVA-spezifische T-Zellen dagegen konnten aus den Milzen von OT-II Spendermäusen ohne magnetische Voranreicherung direkt über folgende Antikörper sortiert werden: anti-Thy-1.1-PacB, anti-CD62L-PE-Cy7, anti-CD4-A700 und anti-B220-APC-Cy7. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von  $3 \times 10^7$  Zellen/ml oberflächengefärbt (siehe 2.6.5.1), mit MACS-PBS gewaschen, in einer Zelldichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in MACS-PBS resuspendiert und durch einen 30  $\mu$ m Filter filtriert. Zur Diskriminierung toter Zellen wurde 1,25  $\mu$ M DAPI zugesetzt. Die Sortierung der Zellen erfolgte am BD FACSAria™ II cell sorter. Die verwendeten Laser- und Filtersysteme waren denen des BD™ LSR II ähnlich.

## 2.6.7 *In vitro* T<sub>H</sub>2-Polarisierung von T-Lymphozyten

Die Voraktivierung und zeitgleiche Polarisierung der OVA-TZR-transgenen T-Zellen in Richtung eines T<sub>H</sub>2-Helfer-Phänotyps erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für fünf Tage. Dafür wurden Zellen aus der Milz OVA-TZR-transgener Mäuse unter sterilen Bedingungen isoliert (siehe 2.6.1.1) und unter Verwendung der magnetischen Zellsortierung auf CD62L<sup>hoch</sup> exprimierende und damit naive T-Zellen angereichert (siehe 2.6.2). Die Kultivierung erfolgte in

Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe. Blockierende Antikörper gegen Maus-IFN- $\gamma$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und Maus-IL-12 (5  $\mu\text{g/ml}$ ), sowie der Zusatz von 20 ng/ml rekombinanten, murinen IL-4 und OVA<sub>323-339</sub>-Peptid (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ermöglichten die Polarisierung der Zellen in Richtung T<sub>H</sub>2. Frisches Medium inklusive der blockierenden Antikörper (ohne OVA<sub>323-339</sub>-Peptid und IL-4) wurde an den Folgetagen je nach Bedarf zugesetzt.

## 2.7 Immunhistochemie (IHC)

### 2.7.1 Silanisieren von Objektträgern

Um eine bessere Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden die Objektträger mit einer Silanverbindung beschichtet, die als Haftvermittler zwischen Glasoberfläche und Gewebe diente. Das Entfetten der Objektträger erfolgte durch deren Einbringen in Aceton für 30 Sek.. Zur Silanisierung wurden die Objektträger für 10 Sek. mit der Silanisierungslösung inkubiert, anschließend zwei Mal für je 10 Sek. mit Ethanol und dH<sub>2</sub>O gespült und ü. N. bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet.

### 2.7.2 Gewebeaufarbeitung

Für die Histologie wurde die Lunge über die Trachea unter Verwendung eines Venenverweilkatheters mit 800-1000  $\mu\text{l}$  50 % Tissue-Tek® gefüllt, anschließend vorsichtig aus dem Tier entnommen, auf ein Korkplättchen gesetzt und mit 100 % Tissue-Tek® überschichtet. Um einen schonenden Einfrierprozess zu gewährleisten, wurde das Gewebe zunächst in eiskaltes Isopropanol getaucht, in Aluminiumfolie gewickelt und nachfolgend in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Die langfristige Lagerung des Gewebes erfolgte bei -70 °C.

### 2.7.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Unter Verwendung eines Kryostats wurden 8  $\mu\text{m}$  Lungenschnitte als Serienschnitte angefertigt und ü. N. bei RT getrocknet. Die anschließende Inkubation der Gewebeschnitte für 10 Min. in Aceton diente der Fixierung. Im Anschluss daran wurden die Gewebeschnitte entweder direkt gefärbt oder bei -70 °C in Kunststoffboxen bis zur Verwendung gelagert.

### 2.7.4 Indirekte Immunperoxidasetechnik

Bestimmte Oberflächenproteine wurden unter Verwendung haptenisierter (FITC, Dig), monoklonaler Primärantikörper nachgewiesen, die mit Peroxidase (POD)-gekoppelten Sekundärantikörpern



(anti-Dig-POD; anti-FITC-POD) detektiert werden konnten. Dazu wurden die Gefrierschnitte zunächst bei RT aufgetaut und für 10 Min. in Aceton fixiert. Um die parallele Anfärbung unterschiedlicher Antigene auf benachbarten Gewebeschnitten eines Objektträgers zu ermöglichen, wurde jeder Gewebeschnitt mehrfach mit einem Wachsstift umkreist. Anschließend erfolgte die Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität durch die Inkubation der Objektträger in einer Peroxidase-Blockierungslösung für 1 h bei 37 °C. Nachfolgendes, zweimaliges Waschen der Objektträger in PBS für 5 Min. diente dazu, verbleibende Blockierungslösung zu entfernen. Zum Waschen wurde dabei der Färbetrog nach Hellendahl verwendet. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten anschließend in einer Feuchteammer bei RT. Die Inkubation der Gewebeschnitte mit 0,5X Casein für 1 h diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Antikörper. Direkt im Anschluss (ohne weiteren Waschschrift) wurden die Gewebeschnitte mit den Dig- oder FITC-haptensierten Primärantikörpern (verdünnt in 0,5X Casein) inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung konnte durch dreimaliges Waschen der Objektträger für jeweils 5 Min. mit PBS/Tween® 20-Waschpuffer entfernt werden, wobei der letzte Waschschrift mit PBS (ohne Tween® 20) durchgeführt wurde. Die Inkubation mit den POD-gekoppelten Sekundärantikörpern Ziege-anti-FITC-POD und Ziege-anti-Dig-POD erfolgte analog zu den Primärantikörpern. Gebundene Antikörper konnten dann durch den Farbstoff 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) detektiert werden, der durch die Peroxidase zu einem rotbraunen, unlöslichen Farbniederschlag an der Stelle des Zielproteins umgesetzt wurde. Die Entwicklung des Farbniederschlages dauerte 10-15 Min.. Im Anschluss daran wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin 5 Min. gegengefärbt und zur Entwicklung der blauen Kernfärbung 5 Min. in Leitungswasser gebläut. Um die Gewebeschnitte langfristig lagern zu können, mussten selbige in Kaisers Glyzeringelatine eingebettet und mit Deckgläschen luftdicht verschlossen werden. Die verwendeten monoklonalen Antikörper (Tabelle 1) wurden zuvor auf ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis titriert.

### **2.7.5 PAS-Färbung**

Zum Anfärben von Mukopolysacchariden und damit schleimproduzierenden Becherzellen wurde das PAS-Färbeset der Fa. Roth (Carl Roth GmbH + Ko.KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. 8 µm Gefrierschnitte der Lunge wurden aufgetaut und für 10 Min. in Aceton fixiert. Die Durchführung der Färbung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

### **2.7.6 Bronchoalveolar-Lavage (BAL) und Diff-Quick® Färbung**

Über die Trachea und die Verwendung eines Venenverweilkatheters wurde die Mauslunge zwei Mal mit je 800 µl PBS gespült und die BAL in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis gesammelt. 100 µl der

BAL wurden durch Zytozentrifugation für 10 min. bei 800 rpm auf Objektträger aufgebracht, die ü. N. getrocknet wurden. Die Verwendung des Diff-Quick® Schnellfärbesets der Fa. Medion Diagnostics AG (Düdingen, Schweiz) ermöglichte die Differenzierung verschiedener Leukozytenpopulationen in der BAL. Die Durchführung der Färbung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

### **2.7.7 Bearbeitung histologischer Aufnahmen**

Die Dokumentation histologischer Präparate erfolgte mit dem Mikroskop Axioskop 2 (Carl Zeiss) und unter Verwendung des Axiovision Software. Nachträglich wurde ein Weißabgleich vorgenommen, wobei die Software Adobe Photoshop CS5 Version 12.0 verwendet wurde.

## **2.8 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)**

### **2.8.1 Gewinnung von Serum**

Die Mäuse wurden durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran kurzzeitig narkotisiert und das Blut mit einer 10 µm Glaskapillare retroorbital entnommen. Zur Agglutination der Erythrozyten erfolgte eine halbstündige Inkubation der Blutproben bei 37 °C, gefolgt von einer ebenso langen Lagerung bei 4 °C. Nachfolgend wurden die Blutzellbestandteile durch zwei Zentrifugationsschritte vom Serum getrennt. Nach Zentrifugation für 10 Min., bei 1 000 x g und 4 °C wurde der erste Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (10 000 x g, 10 Min., 4 °C). Der so gewonnene zweite Überstand, das Serum, konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert werden.

### **2.8.2 Nachweis NP-spezifischer IgE-Antikörper**

Der Nachweis von anti-NP-IgE-Antikörpern im Blut erfolgte mit einem *capture*-ELISA. Dazu wurden MaxiSorp™ Flachboden-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen a' 250 µl) mit einem anti-IgE-Antikörper (Klon R35-72) inkubiert, der in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS ü. N. bei 4 °C an die Platte binden konnte. Der nachfolgende, wie auch alle anderen Waschschrirte, erfolgten unter Verwendung des Plate-Washers PW 96 und dienten dazu, ungebundenes Reagenz zu entfernen. Jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde dabei mehrfach mit PBS/Tween® 20-Waschpuffer für 10 Sek. inkubiert. Waschschrirte erfolgten nach jedem Inkubationsschrirte. Serumproben und der Standard (B1-8; rekombinanter NP-spezifischer IgE AK) wurden nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen (mit PBS/BSA für 30 Min. bei RT) für 2 h bei 37 °C mit der Platte inkubiert. Anschließend erfolgte

die Inkubation mit 0,5 µg/ml NP<sub>28</sub>-BSA (2 h, 37 °C). Gebundenes Nitrophenol konnte nachfolgend mit einem biotinylierten anti-NP-Sekundärantikörper (18-1-16-Bio; 2 µg/ml in PBS, 1 h bei 37 °C) detektiert werden. Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin wurde für 30 Min. bei RT zugegeben. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid (TMB), gelöst in Phosphat-Citrat-Puffer, konnte als Substrat von der Peroxidase umgesetzt werden. Die Farbreaktion wurde durch Zusatz von 1 M Schwefelsäure gestoppt. Mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® 200 PRO (Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich) konnten die Proben photometrisch ausgelesen werden (Messung bei 450 nm, Referenzwellenlänge 630 nm). Die nachfolgende Auswertung und Berechnung der absoluten Konzentrationen wurde unter Verwendung der Software Magellan 7.1 (Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich) durchgeführt.

### 2.8.3 Messung von IL-2 im Zellkulturüberstand

MaxiSorp™ Flachboden-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen a' 250 µl) wurden mit 4 µg/ml anti-IL-2 mAK (Klon JES6-1A12) ü. N. inkubiert, die Platten anschließend mit PBS/Tween® 20-Waschpuffer gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit PBS/BSA/Tween® 20-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Die nachfolgende Inkubation mit den verdünnten Proben und dem Standard (rekombinantes, murines IL-2, Biosource) erfolgten für 1,5 h bei RT. Gebundenes IL-2 aus dem Zellkulturüberstand konnte dann durch einen biotinylierten anti-IL-2 mAK (Klon JES6-5H4; 1 µg/ml in PBS/BSA/Tween® 20) nachgewiesen werden, der im Vergleich zum Erstantikörper ein anderes Epitop erkennt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT, die Detektion und Auswertung wie unter 2.8.2 beschrieben.

### 2.8.4 Statistische Auswertung

Zur graphischen Darstellung und statistischen Analyse der Daten wurde das Softwareprogramm Prism 5.01 (Graphpad Software, San Diego, Kalifornien, USA) für Windows verwendet. Wenn nicht anders angezeigt, repräsentiert jedes Symbol ein Tier. In den Diagrammen dargestellt ist jeweils der Median. Als statistischer Test diente der nichtparametrische Mann-Whitney U-Test. Signifikanzwerte von  $P < 0,05$  galten als statistisch signifikant, wobei \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  ist.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung eines murinen Atemwegsinflammationsmodells

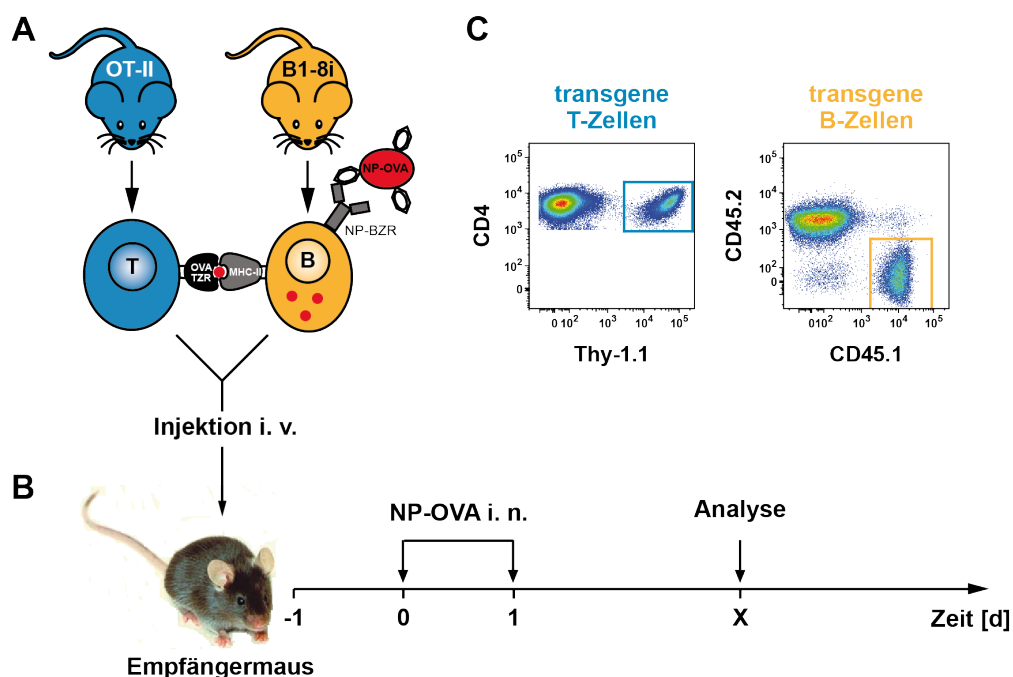
#### 3.1.1 Grundlegende Überlegungen

Die Etablierung eines geeigneten Modellsystems war grundlegend, um die Rolle von ICOS in der Interaktion von T- und B-Zellen untersuchen zu können. Von besonderem Interesse war dabei, welchen Stellenwert ICOS für die Kooperation von T- und B-Zellen außerhalb lymphoider Organe im entzündeten Gewebe hat. Demnach wurde ein Modellsystem benötigt, welches es erlaubt, antigenspezifische T- und B-Zellen zu analysieren, die eine Spezifität für das gleiche Antigen besitzen. Denn nur so ist eine gekoppelte Antigenerkennung (*linked recognition*) und damit eine T-Zell-abhängige Immunantwort induzierbar (Snow, 1983). Um die Relevanz von ICOS studieren zu können, war es wichtig, den Aktivierungszustand dieser Zellen zu einem definierten Zeitpunkt zu kennen und die Zellen im Verlauf der Immunantwort *in vivo* verfolgen zu können. Darüber hinaus sollte das Immunogen lokal appliziert werden, um eine Entzündungsreaktion in der Peripherie hervorzurufen, wobei der Entzündungsherd leicht isolier- und analysierbar sein musste.

#### 3.1.2 Basisprotokoll des Atemwegsinflammationsmodells

Die Basis für das murine Atemwegsinflammationsmodell bildete ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes, adoptives Transfersystem, bei dem antigenspezifische T- und B-Zellen zeitgleich in Empfängerermäuse transferiert werden (Dahler, 2009). Die T-Zellen stammen dabei aus OT-II Mäusen (Barnden, 1998) und besitzen eine T-Zell-Rezeptor (TZR)-Spezifität für Ovalbumin (OVA). B1-8i Mäuse (Sonoda, 1997) dienen als Spendertiere für die antigenspezifischen B-Zellen, deren B-Zell-Rezeptoren (BZR) das Hapten Nitrophenol (NP) erkennen können. Zusätzlich wurde in beide Mauslinien noch ein kongener Marker eingekreuzt, um die Identifizierung der transferierten Zellen *in vivo* zu ermöglichen.  $2-2,5 \times 10^6$  OT-II T-Zellen wurden zusammen mit  $2-2,5 \times 10^6$  folliculären ( $CD21^+ CD23^+$ ) B1-8i B-Zellen durch intravenöse (i. v.) Injektion in die Schwanzvene syngener Empfängerermäuse transferiert (Abbildung 6A). Die vorherige magnetische Sortierung der OT-II Splenozyten auf  $CD62L^{\text{hoch}}$  exprimierende Zellen sollte sicherstellen, dass die T-Zellen zum Zeitpunkt des Transfers naiv und damit antigenunerfahren waren. Weiterhin wurden CD69, CD25 und ICOS als frühe T-Zell-Aktivierungsmarker gemessen, um den naiven Phänotyp der zu transferierenden T-Zellen zu bestätigen (Daten nicht gezeigt). Die Depletion aller  $CD43^+$  Zellen aus der B1-8i-Splenozytensuspension bewirkte die Entfernung aller B1-8i Spender-T-Zellen. Die Verwendung eines NP-OVA-Konjugats ermöglichte es, die Kooperation von T- und B-Zellen zu induzieren

(Abbildung 6A). Dabei erkennen die B-Zellen das Hapten NP, welches sie über den NP-spezifischen BZR binden und infolgedessen den gesamten Hapten-Träger-Komplex internalisieren und prozessieren. Peptidfragmente des Trägerproteins (OVA) werden dann über MHC-II-Moleküle den T-Zellen präsentiert und damit eine gekoppelte Antigenerkennung initiiert. Um eine Atemwegsinfektion auszulösen, wurden 5-50  $\mu\text{g}$  lösliches NP-OVA an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer (d0, d1) intranasal (i. n.) verabreicht (Abbildung 6B). Die sofortige intranasale Antigengabe war dabei vergleichbar effizient in der Auslösung der Entzündungsreaktion, wie die subkutane Immunisierung mit darauffolgender i. n. Antigenapplikation (Daten nicht gezeigt). Eine mehrmalige Antigengabe kleinerer Mengen an NP-OVA war zudem ebenfalls effizienter als die einmalige Gabe der gleichen Gesamtantigenmenge (Daten nicht gezeigt). Über die kongenen Marker Thy-1.1 (CD90.1) und CD45.1 ist es möglich, die transgenen T- und B-Zellen von der endogenen T- und B-Zellpopulation der Empfängermause durchflusszytometrisch abzugrenzen und *in vivo* zu verfolgen (Abbildung 6C). Dieses Modellsystem ermöglicht es, das Zielorgan (die Lunge) sowie den dazugehörigen drainierenden Lymphknoten (*Ln. tracheobronchialis*, Van den Broeck, 2006) zu analysieren und erlaubt es somit, immunologische Prozesse in lymphoiden und peripheren, nicht-lymphoiden Organen parallel zu verfolgen.



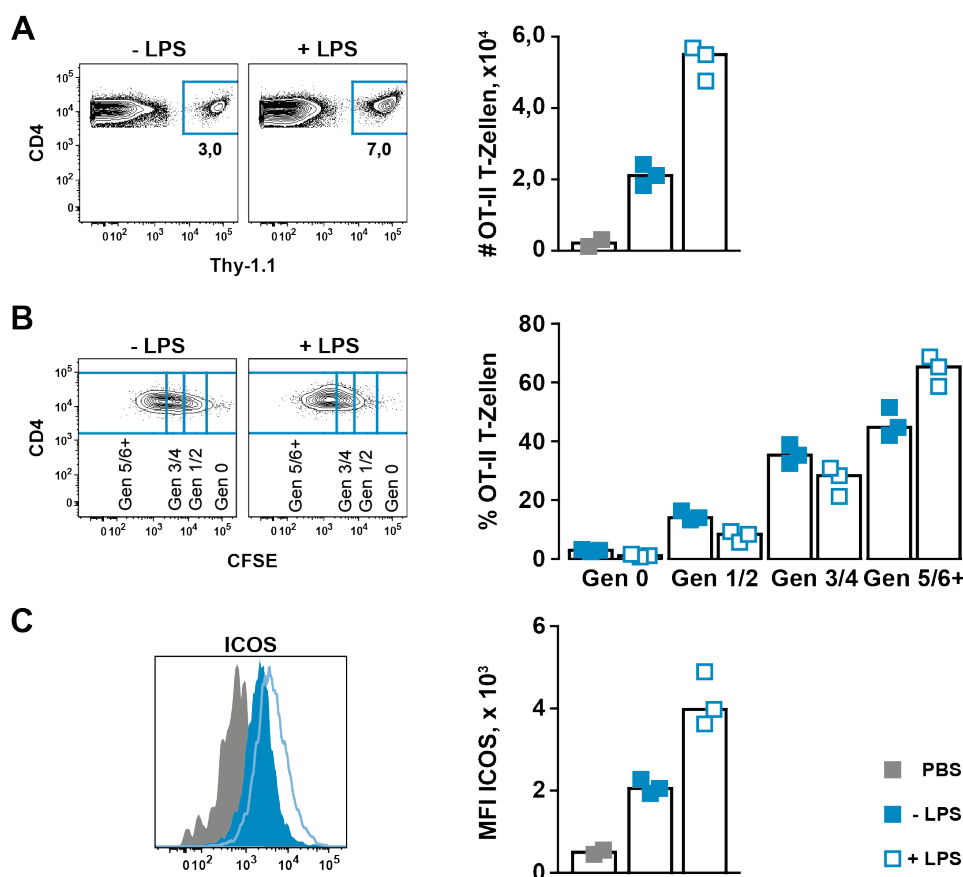
**Abbildung 6. Murines Atemwegsinfektionsmodell.**

(A) schematische Darstellung des adoptiven Transfersystems.  $2-2,5 \times 10^6$  OVA-spezifische T-Zellen aus OT-II Mäusen und  $2-2,5 \times 10^6$  folliculäre ( $\text{CD}21^+ \text{CD}23^+$ ), NP-spezifische B-Zellen aus B1-8i Mäusen werden intravenös (i. v.) in syngene C57BL/6-Mäuse transferiert. Die Gabe eines NP-OVA-Konjugats ermöglicht die gekoppelte Antigenerkennung und damit T-B-Kooperation. (B) Induktion der Atemwegsinfektion durch intranasale (i. n.) Antigengabe von 5-50  $\mu\text{g}$  NP-OVA an

d0 und d1 nach Transfer und Analyse der Lunge und des tracheobronchealen Lymphknotens zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (C) Identifizierung transgener T- und B-Zellen über die kongenen Marker Thy-1.1 und CD45.1 in der Durchflusszytometrie. Transgene T-Zellen sind DAPI<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup>, transgene B-Zellen sind DAPI<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G/C<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup>. NP-BZR Nitrophenol-spezifischer B-Zell-Rezeptor; OVA-TZR Ovalbumin-spezifischer T-Zell-Rezeptor; MHC *major histocompatibility complex*; T T-Lymphozyt; B B-Lymphozyt; NP-OVA Nitrophenol-Ovalbumin-Konjugat.

### 3.1.3 Wirkung von LPS auf die T-Zell-Aktivierung

Proteinantigene rufen, wenn allein verabreicht, nur schwache Immunantworten hervor. Der Gebrauch von Adjuvantien ist daher häufig erforderlich, wenn man starke, adaptive Immunantworten induzieren möchte. Lipopolysaccharid (LPS) ist solch ein Adjuvans. LPS ist ubiquitär verbreitet und findet sich auch in der Luft. Es stellt damit ein natürliches Adjuvans dar und sollte daher zur Induktion der Atemwegsentzündung in diesem Modellsystem genutzt werden. Zu Beginn der Arbeit galt es, die Wirkung von LPS auf verschiedene Zellen in unserem Atemwegsentzündungsmodell näher zu untersuchen. Dabei stand zunächst einmal nur der Einfluss von LPS auf die Aktivierung der OVA-spezifischen T-Zellen im Fokus. Je  $2,5 \times 10^6$  transgene T- und B-Zellen wurden dazu in C57BL/6 Empfängertiere transferiert. Um den Effekt von LPS auf die T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurden den Tieren einer Gruppe an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem adoptiven Transfer 50 µg NP-OVA + 5 µg LPS i. n. verabreicht. Die Vergleichsgruppe erhielt 50 µg NP-OVA ohne zusätzliches LPS. Tiere, denen PBS i. n. appliziert wurde, dienten als Kontrollgruppe. Grundsätzlich führte die intranasale Antigengabe eines Proteinantigens allein schon zu erhöhten T-Zellzahlen im Lungengewebe. So lassen sich drei Tage nach der letzten Antigengabe im Vergleich zur Kontrollgruppe ca. zehn Mal so viele T-Zellen in der Lunge finden (Abbildung 7A). Durch die zusätzliche Gabe von LPS kann der Anteil an antigenspezifischen T-Zellen noch weiter erhöht werden und so stieg die T-Zellzahl im Vergleich zur Gruppe ohne LPS um mehr als das Doppelte an (Abbildung 7A). Die Analyse der Proliferation dieser Zellen unter Verwendung des CFSE-Verdünnungstests (siehe 2.6.5.3) ergab, dass sich mehr als 65 % der transgenen T-Zellen unter LPS-Zusatz mehr als vier Mal teilten, wohingegen es in Abwesenheit von LPS nur ca. 45 % der Zellen waren (Abbildung 7B). Des Weiteren verstärkt LPS die Heraufregulation von ICOS um nahezu das Doppelte und hat damit einen starken Einfluss auf den Aktivierungsstatus der T-Zelle (Abbildung 7C).



**Abbildung 7. Wirkung von LPS auf die T-Zell-Aktivierung.**

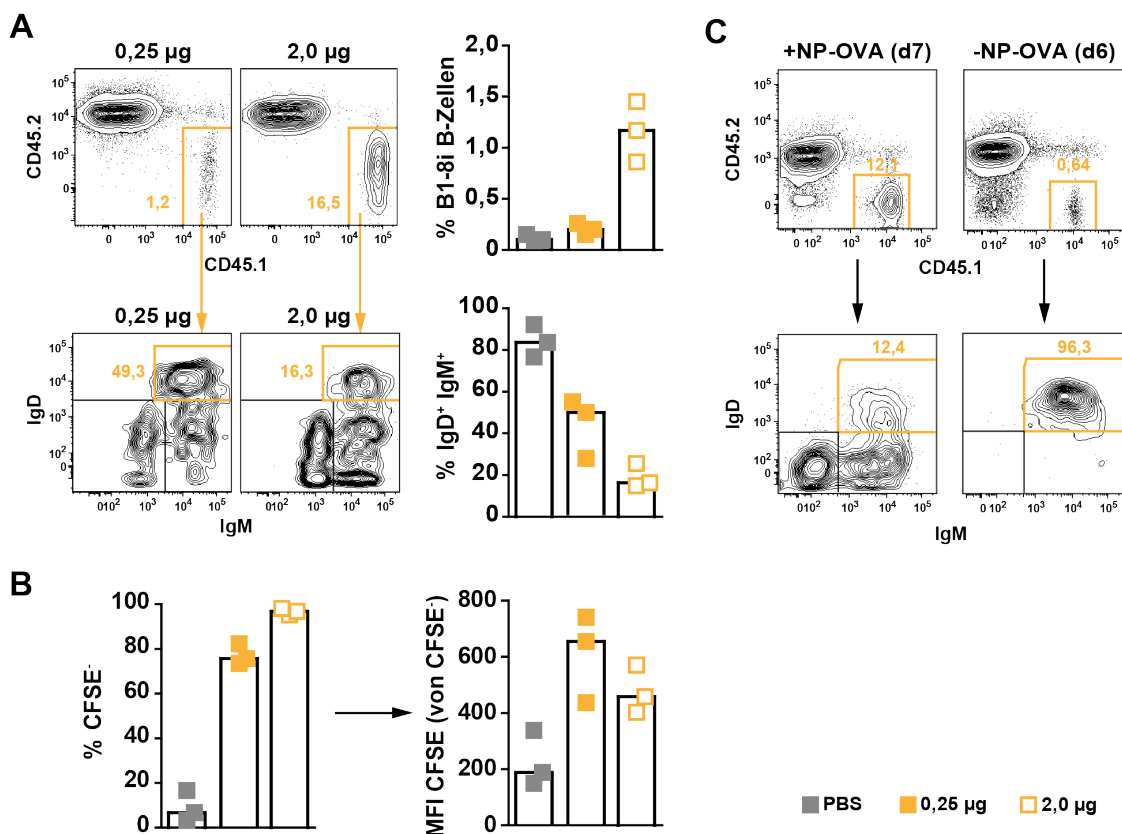
2,5 x 10<sup>6</sup> OVA-spezifische T-Zellen wurden mit der gleichen Anzahl an NP-spezifischen B-Zellen in C57BL/6 Empfängermause transferiert. Die Immunisierung der Tiere erfolgte an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer mit 50 µg NP-OVA ± 5 µg LPS über die Nase (n = 3). Kontrolltiere erhielten nur PBS (n = 2). 3d nach der letzten Antigengabe wurden die Lungen der Tiere analysiert. **(A)** links: repräsentative Färbung auf transgene, OVA-spezifische T-Zellen in der Lunge, definiert als DAPI B220<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup>, rechts: absolute Zellzahlen an transgenen, OVA-spezifischen T-Zellen in der Lunge an d3 unter den gegebenen Bedingungen. **(B)** Analyse der Zellproliferation durch Markierung der Zellen mit CFSE, links: repräsentative durchflusszytometrische Analyse, rechts: Verteilung der transgenen T-Zellen auf die einzelnen Generationen (Gen) in An- bzw. Abwesenheit von LPS. **(C)** Einfluss von LPS auf die Stärke der ICOS-Expression. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von ICOS für alle transgenen T-Zellen unter den gegebenen Bedingungen. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Die Höhe der Balken im Histogramm entspricht dem Median.

### 3.1.4 Wirkung von LPS auf die B-Zell-Aktivierung

Nachdem ein positiver Einfluss von LPS auf die T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden konnte (siehe 3.1.3), sollten auch die transgenen B-Zellen auf einen möglichen Einfluss von LPS hin untersucht werden. LPS stellt ein sogenanntes polyklonales Mitogen für B-Zellen dar. Das bedeutet, dass B-Zellen in Anwesenheit von LPS antigenunabhängig zur Proliferation angeregt werden können (Andersson, 1973). Verabreicht man den Mäusen NP-OVA ohne zusätzliches LPS, so lassen sich nur

extrem wenige bis überhaupt keine B-Zellen in der Lunge detektieren (Daten nicht gezeigt). Der Zusatz von LPS zum Antigen spielt somit auch für die Proliferation und Aktivierung der B-Zellen eine entscheidende Rolle, wobei dieser Einfluss direkt über die mitogene Wirkung von LPS und indirekt über eine gesteigerte T-Zell-Aktivierung vermittelt werden kann. Setzt man jedoch zu große Mengen an LPS ein, birgt das die Gefahr, dass NP-spezifische B-Zellen überwiegend antigenunabhängig aktiviert werden. Dies wäre für die Untersuchung der Rolle von ICOS in der T-B-Interaktion von Nachteil. Deshalb war es notwendig, die Menge an LPS zu bestimmen, die ausreichend ist, um die B-Zellen effizient und überwiegend antigenabhängig zu stimulieren. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  T- und B-Zellen, wie zuvor beschrieben, in C57BL/6 Empfängermause transferiert, die zweimalig mit  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA intranasal immunisiert wurden. Einige Mäuse erhielten zusätzlich zum Proteinantigen  $0,25 \mu\text{g}$  LPS, andere  $2 \mu\text{g}$  LPS über die Nase. Den Kontrolltieren wurde PBS ohne NP-OVA/LPS i. n. verabreicht. Sechs Tage nach der letzten Antigengabe erfolgte die Isolation und Analyse der NP-spezifischen B-Zellen aus der Lunge. Wenig LPS ( $0,25 \mu\text{g}$ ) führt zu geringen Frequenzen an transgenen B-Zellen im Gewebe, wobei eine Erhöhung der LPS-Menge auf  $2 \mu\text{g}$  die Frequenz an B-Zellen in der Lunge deutlich steigert (Abbildung 8A, oben). Auch der Aktivierungsstatus der B-Zellen, gemessen an der Herunterregulation der Oberflächenimmunglobuline IgD und IgM, wird durch die Menge an LPS beeinflusst. So weisen über 50 % der transgenen B-Zellen in der Lunge an Tag sieben einen naiven Phänotyp auf, wenn nur wenig LPS verabreicht wurde. In Anwesenheit von  $2 \mu\text{g}$  LPS sind es weniger als 20 %, die  $\text{IgD}^+ \text{IgM}^+$  bleiben (Abbildung 8A, unten). Nahezu alle B-Zellen haben sich unter dem Einfluss von NP-OVA +  $2 \mu\text{g}$  LPS geteilt, nur 75 % in Anwesenheit von NP-OVA +  $0,25 \mu\text{g}$  LPS. Die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE, und damit die durchschnittliche Menge an CFSE pro B-Zelle, ist innerhalb der  $\text{CFSE}^{\text{niedrig}}$  Population bei höherer LPS-Menge geringer. Das bedeutet, dass sich jede B-Zelle in Anwesenheit höherer LPS-Mengen durchschnittlich häufiger teilt (Abbildung 8B). LPS allein ( $5 \mu\text{g}$ ), in Abwesenheit eines Proteinantigens (NP-OVA), hat keinen Einfluss auf die Proliferation und Aktivierung der NP-spezifischen B-Zellen in der Lunge (Abbildung 8C). Dadurch kann eine mitogene Wirkung der hier verwendeten Mengen an LPS ausgeschlossen werden. Dennoch kommt es mit steigender LPS-Menge zu einer erhöhten Aktivierung und Proliferation der transgenen B-Zellen, was sehr wahrscheinlich auf die gesteigerte Aktivierung der OVA-spezifischen T-Zellen (siehe 3.1.3) zurückgeführt werden kann.





**Abbildung 8. Wirkung von LPS auf die B-Zell-Aktivierung.**

$2 \times 10^6$  OVA-spezifische T-Zellen wurden mit der gleichen Anzahl an NP-spezifischen B-Zellen in C57BL/6 Empfängermäuse transfertiert. Die Immunisierung der Tiere erfolgte an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer mit  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA  $\pm$   $0,25 \mu\text{g}$ ,  $2 \mu\text{g}$  oder  $5 \mu\text{g}$  LPS über die Nase ( $n = 3$ ). Kontrolltiere erhielten nur PBS ( $n = 3$ ). 6d nach der letzten Antigengabe wurden die Lungen der Tiere analysiert. **(A)** repräsentative durchflusszytometrische Analyse auf NP-spezifische B-Zellen (definiert als DAPI<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G/C<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup>) und die Expression der Oberflächenimmunglobuline IgD/IgM zur Beurteilung des Aktivierungsstatus. Diagramme zeigen die Ergebnisse aller Tiere einer Gruppe. **(B)** Analyse der B-Zell-Proliferation unter Verwendung des CFSE-Verdünnungstests. Dargestellt sind die Frequenz an geteilten (CFSE<sup>-</sup>), NP-spezifischen B-Zellen (links) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE der geteilten B-Zell-Population (rechts) unter den gegebenen Bedingungen. **(C)** Untersuchung der mitogenen Wirkung von LPS in Abwesenheit eines Proteinantigens. Untersucht wurden die Frequenz und Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen in der Lunge nach Applikation von NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS versus  $5 \mu\text{g}$  LPS (ohne NP-OVA). Die Höhe der Balken in den Diagrammen repräsentiert den Median. Zahlenwerte in den FACS-Plots geben die jeweiligen Frequenzen der eingegrenzten Zellpopulationen in Bezug auf die Elternpopulationen an. MFI mittlere Fluoreszenzintensität; CFSE 5, 6-Carboxyfluorescein Succinimidylester; NP-OVA Nitrophenol-Ovalbumin-Konjugat; LPS Lipopolysaccharid; IgD/M Immunglobulin D/M.

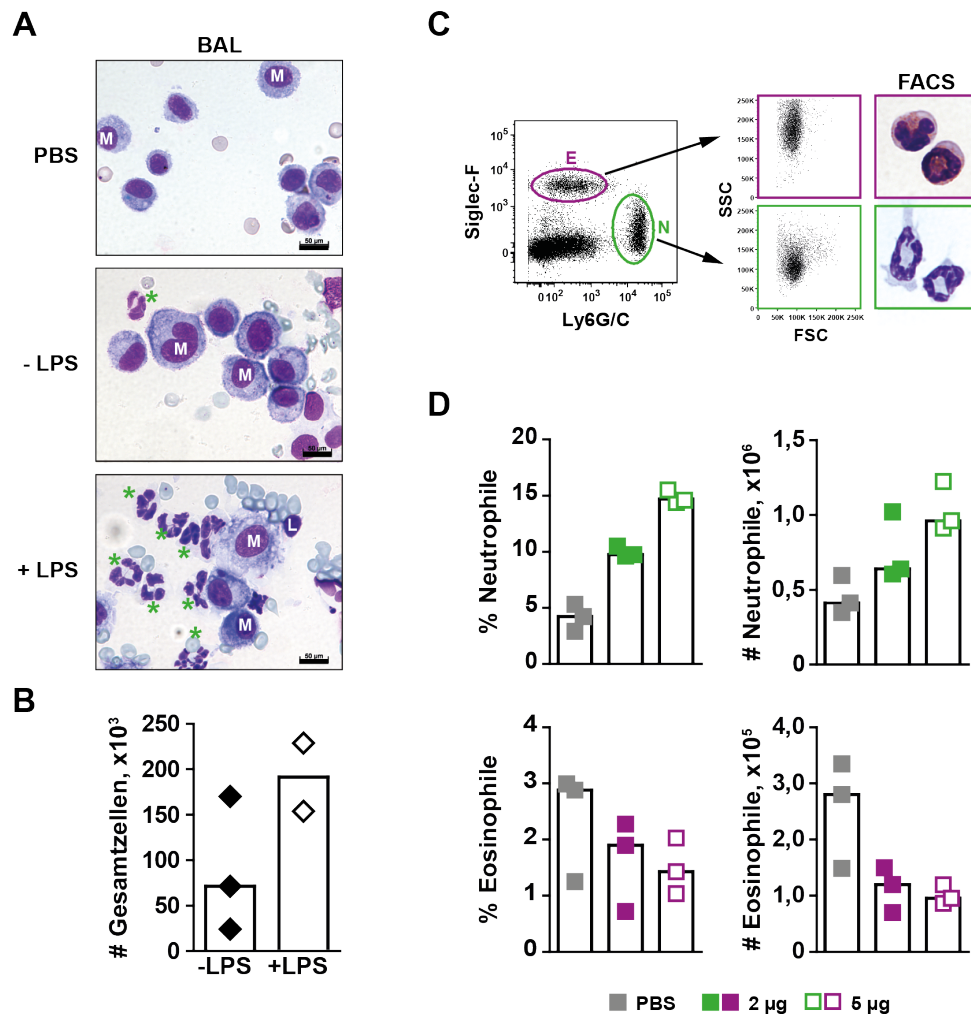
### 3.1.5 LPS fördert den Einstrom von Neutrophilen ins Lungengewebe

Während einer Entzündungsreaktion kommt es nicht nur zum Einstrom von Lymphozyten. Es sind auch Zellen des angeborenen Immunsystems an der Abwehrreaktion beteiligt. Allen voran sind es die neutrophilen Granulozyten, die noch vor den Lymphozyten ins entzündete Gewebe einwandern und Pathogene über bestimmte Oberflächenrezeptoren erkennen und abtöten können (Witko-Sarsat, 2000).

Durch die Expression von CD14, einem Oberflächenrezeptor, der LPS im Komplex mit dem LPS-bindenden Protein (LBP) erkennt, sind Neutrophile in der Lage, auf LPS zu reagieren (Wright, 1991). Ziel der vorliegenden Arbeit war es jedoch, ein Atemwegsinfektionsmodell zu entwickeln, das sich durch die Dominanz eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe auszeichnet, da Eosinophile maßgeblich an der Entstehung und Progression der humanen Asthmaerkrankung beteiligt sind. Aus diesem Grund war es wichtig, zu untersuchen, welchen Einfluss LPS im vorliegenden Mausmodell auf die Einwanderung neutrophiler bzw. eosinophiler Granulozyten hat.

Nach adoptivem Transfer und Immunisierung der Mäuse mit 50 µg NP-OVA ± 5 µg LPS i. n. wurde, drei Tage nach der letzten Antigengabe, eine Bronchoalveolar-Lavage (BAL) durchgeführt. Diese Spülung der unteren Atemwege dient dazu, zelluläre (wie auch nicht zelluläre) Bestandteile zu isolieren, die dann zytologisch untersucht werden können. Nach mikroskopischer Betrachtung der differenziell angefärbten Präparate zeigte sich, dass die BAL von Mäusen, die nur NP-OVA in Abwesenheit von LPS intranasal verabreicht bekamen, überwiegend Makrophagen, wenige neutrophile Granulozyten und überhaupt keine eosinophilen Granulozyten enthält (Abbildung 9A, Mitte). Die zeitgleiche Gabe von LPS dagegen bewirkt einerseits die Zunahme der Gesamtzellzahl der BAL (Abbildung 9B) und führt andererseits auch zu einem enormen Einstrom von neutrophilen Granulozyten (Abbildung 9A, unten). Um den Anteil an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im Lungengewebe besser quantifizieren zu können, wurden Granulozyten des Lungengewebes auch durchflusszytometrisch untersucht. Die Identifizierung der zwei unterschiedlichen Granulozytenpopulationen wurde in Anlehnung an die von Stevens (Stevens, 2007) und van Rijt (van Rijt, 2004) publizierte Färbekombinationen, zur Identifizierung von Eosinophilen und Neutrophilen im murinen Respirationstrakt, durchgeführt. Danach lassen sich eosinophile Granulozyten anhand ihrer Expression von Siglec-F (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F*), sowie unter Einbezug ihrer Größe (FSC<sup>gering</sup>) und Granularität (SSC<sup>hoch</sup>) von neutrophilen Granulozyten unterscheiden, die Siglec-F<sup>-</sup> Ly6G/C<sup>hoch</sup> und weniger granulär (SSC<sup>gering</sup>) sind (Abbildung 9C). Zusätzlich dazu wurden die so identifizierten Zellpopulationen unter Nutzung der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) sortiert und zytologisch analysiert. Die mikroskopische Auswertung der Präparate zeigte die für eosinophile Granulozyten typischen leuchtend roten, eosinophilen Granula, die in Neutrophilen mit sauren Farbstoffen nur schwach anfärbbar sind (Abbildung 9C, rechts). Damit war es möglich, Granulozyten im Lungengewebe durchflusszytometrisch zu analysieren und ihre Frequenz und absolute Zellzahl zu bestimmen. Die durchflusszytometrische Analyse von Lungenzellen aus Mäusen, die zusammen mit dem Proteinantigen LPS verabreicht bekamen, zeigte, dass unter diesen Bedingungen ca. doppelt so viele Neutrophile wie Eosinophile im Lungengewebe zu finden sind. Dabei ist die Stärke der Neutrophileninfiltration von der Menge an

LPS, nicht aber von der Menge an Proteinantigenen abhängig, da mit steigender LPS-Menge auch die absolute Zellzahl an neutrophilen Granulozyten ansteigt (Abbildung 9D und Daten nicht gezeigt). Eosinophile Granulozyten dagegen sind umso stärker in ihrer Frequenz und Anzahl reduziert.



**Abbildung 9. Einfluss von LPS auf die Einwanderung von Granulozyten ins Lungengewebe.**

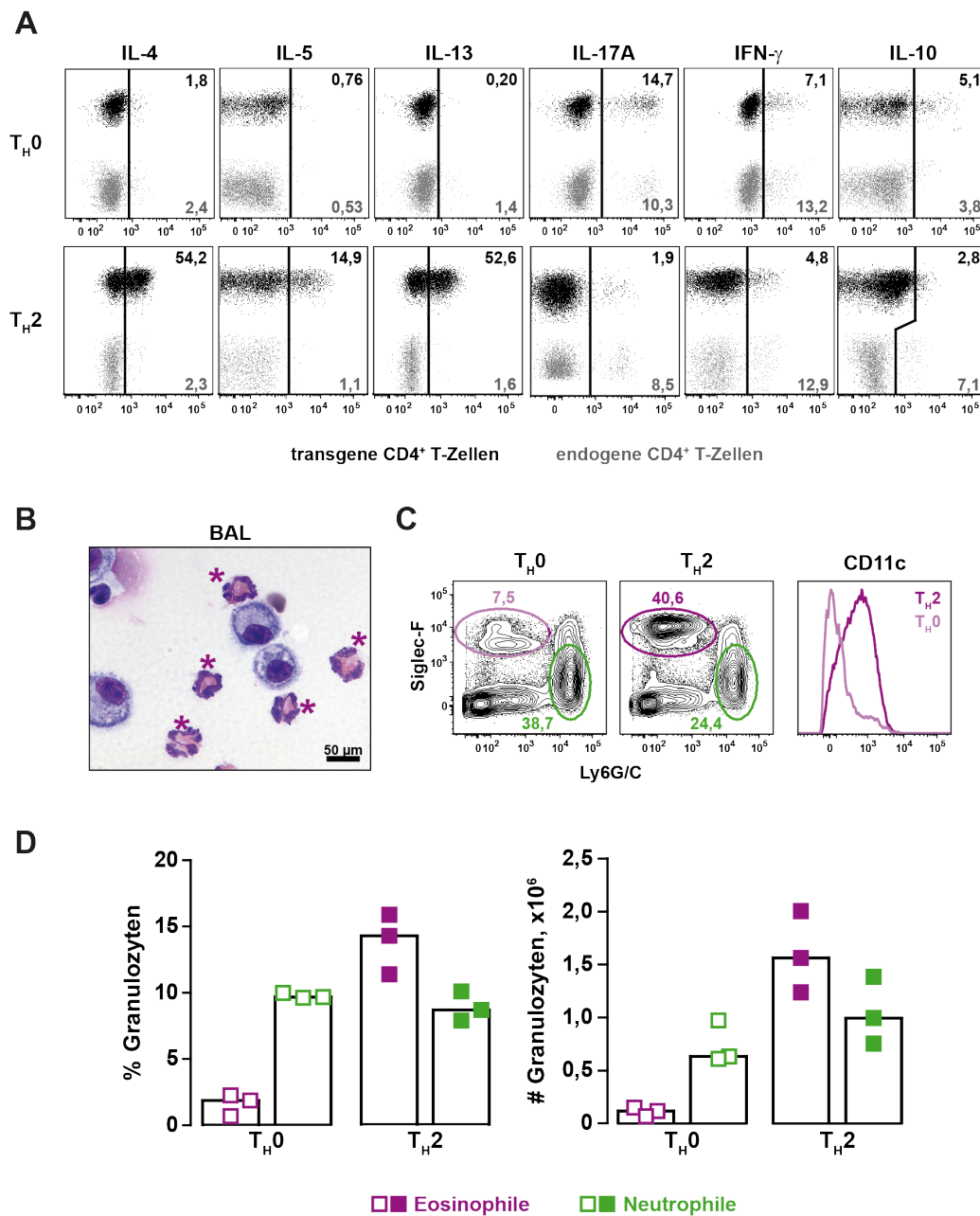
$2,5 \times 10^6$  OT-II T-Zellen und  $2,5 \times 10^6$  B1-8i B-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse transferiert. An den zwei Tagen nach dem Transfer erfolgte die i. n. Gabe von  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA  $\pm 2$  oder  $5 \mu\text{g}$  LPS. Analyse der Bronchoalveolar-Lavage (BAL, A+B) und des Lungengewebes (C+D) 3d nach der letzten Antigengabe. **(A)** Analyse der BAL über differenzielle Färbung von Zytospins auf das Vorhandensein von Makrophagen (M), Lymphozyten (L) und neutrophilen Granulozyten (\*); Vergrößerung: 100X, Maßstabsbalken:  $50 \mu\text{m}$ . **(B)** Absolute Zellzahl an BAL-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS. **(C)** durchflusszytometrische Analyse und FACS-Analyse von eosinophilen (E) und neutrophilen (N) Granulozyten. Eosinophile sind DAPI AFZ<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> Siglec-F<sup>+</sup> Ly6G/C<sup>-</sup> SSC<sup>hoch</sup>, Neutrophile sind DAPI AFZ<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> Siglec-F<sup>-</sup> Ly6G/C<sup>hoch</sup> SSC<sup>gering</sup>. **(D)** absolute Zellzahl und Frequenz (bezogen auf DAPI Zellen) von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in der Lunge in Abhängigkeit von der angegebenen LPS-Menge. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier ( $n = 3$ ). Die Höhe der Balken im Histogramm zeigt den Median an. FACS Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung; LPS Lipopolysaccharid; FSC Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*); SSC Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*).

### 3.1.6 Durch *in vitro* T<sub>H</sub>2-Polarisierung der T-Zellen kann die Zahl an Eosinophilen in der Lunge erhöht werden

Eosinophile Granulozyten sind an der Progression des humanen, allergischen Asthmas wesentlich beteiligt (siehe Abschnitt 1.5). Daher stellte die Anwesenheit eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe für unser Mausmodell ein wichtiges Kriterium dar. Ursächlich für die Mobilisierung dieser Zellen ist die Ausschüttung bestimmter Zytokine im Verlauf einer Immunreaktion. Besonders IL-5, das von T-Helferzellen vom Typ 2 (T<sub>H</sub>2), einer Subpopulation von T-Effektorzellen (siehe Abschnitt 1.3.2), ausgeschüttet wird, fördert die Reifung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark und deren Freisetzung in die Zirkulation (Yamaguchi, 1988).

Die Verwendung von LPS als Adjuvans erhöht den Einstrom von Neutrophilen ins Lungengewebe, wobei Eosinophile nur in geringen Frequenzen im Lungengewebe detektierbar sind (siehe 3.1.5). Um eine verstärkt T<sub>H</sub>2-gerichtete Immunantwort zu bekommen, und damit den Anteil an eosinophilen Granulozyten in der Lunge zu erhöhen, wurden die OVA-spezifischen T-Zellen *in vitro* in Richtung eines T<sub>H</sub>2-Zell-Phänotyps polarisiert. T<sub>H</sub>2-Zellen lassen sich *in vivo* im Vergleich zu T<sub>H</sub>1-Zellen nur schwer induzieren. Der darauffolgende adoptive Transfer sowie die intranasale Antigenapplikation, erfolgten wie zuvor beschrieben (siehe 3.1.5). Um das Zytokinpotential der antigenspezifischen T-Zellen zu testen, wurden Lungenzellen, sechs Tage nach der letzten Antigengabe, isoliert und *in vitro* mit PMA/Ionomycin restimuliert. Zellen, die *in vitro* in Richtung T<sub>H</sub>2 polarisiert wurden, sind in der Lage, IL-4, IL-5 und IL-13 in hohem Maße zu produzieren. Dagegen produzieren OVA-spezifische T-Zellen, die zum Zeitpunkt des Transfers einen T<sub>H</sub>0-Zell-Phänotyp besaßen, verstärkt IL-17A und IFN- $\gamma$ , jedoch kaum T<sub>H</sub>2-Zytokine (Abbildung 10A). Damit wird deutlich, dass sich durch die Polarisierung der T-Zellen, eine Verschiebung der Immunantwort von einer T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1-gerichteten Reaktion hin zu einer T<sub>H</sub>2-gerichteten Immunantwort erreichen lässt. Die Fähigkeit, IL-5 zu produzieren, steigert zudem die Frequenz und Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Lungengewebe. So lassen sich in der BAL von Mäusen, denen T<sub>H</sub>2-polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen transferiert wurden, im Gegensatz zu Mäusen, die T<sub>H</sub>0-Zellen erhielten, eosinophile Granulozyten anfärben (Abbildung 10B und Abbildung 9A). Die erhöhte Frequenz an Eosinophilen in der Lunge konnte auch durchflusszytometrisch bestätigt werden (Abbildung 10C+D). Dabei lässt die verstärkte Expression von Siglec-F durch Eosinophile, verbunden mit einer erhöhten CD11c-Expression, vermuten, dass diese Zellen in Anwesenheit von T<sub>H</sub>2-Zellen, nicht aber T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1-Effektorzellen, einen aktivierten Phänotyp besitzen (Rose, 2010). Die quantitative Analyse der Granulozyten in der Lunge ergab, dass T<sub>H</sub>2-polarisierte T-Zellen eine Verschiebung des Verhältnisses von Neutrophilen zu Eosinophilen in Richtung Eosinophile herbeiführen (Abbildung 10D), und so lassen sich in Anwesenheit der T<sub>H</sub>2-Zellen deutlich mehr Eosinophile in der Lunge

finden. Demnach ist es möglich, eine Eosinophilie, durch die *in vitro* T<sub>H</sub>2-Polarisierung der antigenspezifischen T-Zellen, zu induzieren.



**Abbildung 10.** Effekte der *in vitro* T<sub>H</sub>2-Polarisierung.

OVA-spezifische T-Zellen wurden *in vitro* in Anwesenheit von OVA-Peptid, rekombinantem IL-4, anti-IL-12 mAK und anti-IFN- $\gamma$  mAK für 5d in Richtung T<sub>H</sub>2 polarisiert. Transfer von  $2 \times 10^6$  naiven oder T<sub>H</sub>2-polarisierten, OVA-spezifischen T-Zellen zusammen mit  $2 \times 10^6$  folliculären, NP-spezifischen B-Zellen in C57BL/6 Rezipienten. An d0 und d1 erfolgte die i. n. Gabe von 50  $\mu$ g NP-OVA + 2  $\mu$ g (B-D) oder 5  $\mu$ g (A) LPS. Analyse der BAL 3d und der Lunge 3d (C+D) und 5d (A) nach der letzten Antigengabe. (A) repräsentative durchflusszytometrische Analyse (intrazelluläre Färbung) der angezeigten Zytokine in T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>2-Zellen aus der Lunge nach *in vitro* Restimulation mit PMA/Ionomycin und BrefA. (B)

repräsentative zytologische Analyse der BAL aus Mäusen, die T<sub>H</sub>2-Zellen transferiert bekamen, mittels Diff-Quick Färbung. \* indiziert eosinophile Granulozyten, Vergrößerung: 100X, Maßstabsbalken: 50 µm. (C) repräsentative durchflusszytometrische Färbung auf eosinophile und neutrophile Granulozyten in der Lunge an d4 unter T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>2-Bedingungen sowie Analyse der CD11c-Expression auf Eosinophilen. (D) Frequenz (bezogen auf DAPI Zellen) und absolute Zellzahl an Eosinophilen und Neutrophilen in der Lunge an d4 unter den angegebenen experimentellen Bedingungen (n = 3). Jedes Symbol in den Diagrammen repräsentiert ein Tier. Die Höhe der Balken entspricht dem Median. BAL Bronchoalveolar-Lavage; T<sub>H</sub>0 T-Lymphozyten waren zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers naiv; T<sub>H</sub>2 T-Lymphozyten waren zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers in Richtung eines T-Helferzell-2-Phänotyps polarisiert.

### 3.1.7 Vergleich des neuen Modells mit einem Standardmodell

Das klassische Modell einer Atemwegsentzündung in der Maus, ist das der aktiven Sensibilisierung, welches überwiegend unter Nutzung von BALB/c-Mäusen angewendet wird. Um das in dieser Arbeit neu etablierte Modell mit einem Standardmodell vergleichen zu können, wurden BALB/c-Mäuse nach dem Standardprotokoll für die aktive Sensibilisierung behandelt. Zunächst erfolgte die zweimalige Immunisierung der Tiere durch die intraperitoneale (i. p.) Gabe von 50 µg NP-OVA/ALUM im Abstand von 14 Tagen. Die Sensibilisierung i. p. war notwendig, um eine Expansion der antigenspezifischen endogenen T-Zellen zu bewirken, die ohne adoptiven Transfer in nur sehr geringen Frequenzen vorzufinden sind. Nach Ablauf von 20 Tagen wurde das Antigen lokal appliziert, indem 50 µg lösliches NP-OVA über einen Zeitraum von vier Wochen insgesamt sechs Mal i. n. verabreicht wurden (Abbildung 11A, unten). Dies sollte eine lokale Immunantwort induzieren. Im Vergleich dazu, wurden C57BL/6-Mäuse nach dem neu etablierten Protokoll behandelt, wobei diesmal 50 µg NP-OVA + 5 µg LPS insgesamt vier Mal i. n. appliziert wurden (Abbildung 11A, oben). Mäuse, die anstelle des Antigens PBS i. p. injiziert bekamen, und nachfolgend mit NP-OVA provoziert wurden, bildeten die Kontrollgruppe für die aktive Sensibilisierung. Kontrolltiere für das neu etablierte Atemwegsentzündungsmodell erhielten PBS anstelle des Proteinantigens über die Nase. Anschließend wurden die Lungen dieser Tiere histologisch analysiert, um die Stärke der Inflammation, gemessen an der Stärke der Infiltration, der Zahl an eingewanderten Eosinophilen und dem Auftreten schleimproduzierender Becherzellen, zu beurteilen. Zusätzlich wurde auch das Serum der Tiere auf das Vorkommen von NP-spezifischem IgE analysiert.

Die Behandlung der Mäuse führte in beiden Modellsystemen zur Bildung von antigenspezifischem IgE. Die Konzentration an anti-NP-IgE im Serum der C57BL/6-Mäuse ist dabei vergleichbar hoch, wenn nicht sogar höher als die im Serum von BALB/c-Mäusen, die nach dem Standardprotokoll behandelt worden sind (Abbildung 11B). Durch beide Behandlungsprotokolle wurde eine starke, zelluläre Infiltration im Lungengewebe verursacht, die perivascular lokalisiert ist und in den Lungen der Kontrolltiere nicht beobachtet werden kann (Abbildung 11C, links). Eosinophile Granulozyten, die histologisch über das *major basic protein* (MBP) angefärbt werden können, befinden sich, in beiden

Modellsystemen vergleichbar, in hoher Zahl innerhalb der Infiltrate und sind in der Kontrollgruppe entweder vollkommen abwesend (adoptives Transfersystem) oder in ihrer Zahl stark reduziert (aktive Sensibilisierung) (Abbildung 11C, Mitte). Ein weiteres Kennzeichen der Asthmaerkrankung ist die sogenannte Becherzellen-Hyperplasie. Dabei kommt es zu einer starken Vermehrung der schleimproduzierenden Becherzellen, die histologisch über die Anfärbung von Mukopolysacchariden (Schleim) nachweisbar sind. Unter Verwendung der PAS (*Periodic Acid-Schiff*)-Reaktion konnten in den Lungen beider Gruppen Mukopolysaccharide angefärbt werden, die über ihre pinke Färbung identifizierbar sind (Abbildung 11C, rechts). Durch den Vergleich mit einem bereits etablierten Standardmodell wird deutlich, dass das in dieser Arbeit etablierte Atemwegsinflamationsmodell durchaus mit konventionellen Modellsystemen konkurrieren kann und wichtige Schlüsselkomponenten einer allergischen Reaktion aufweist.

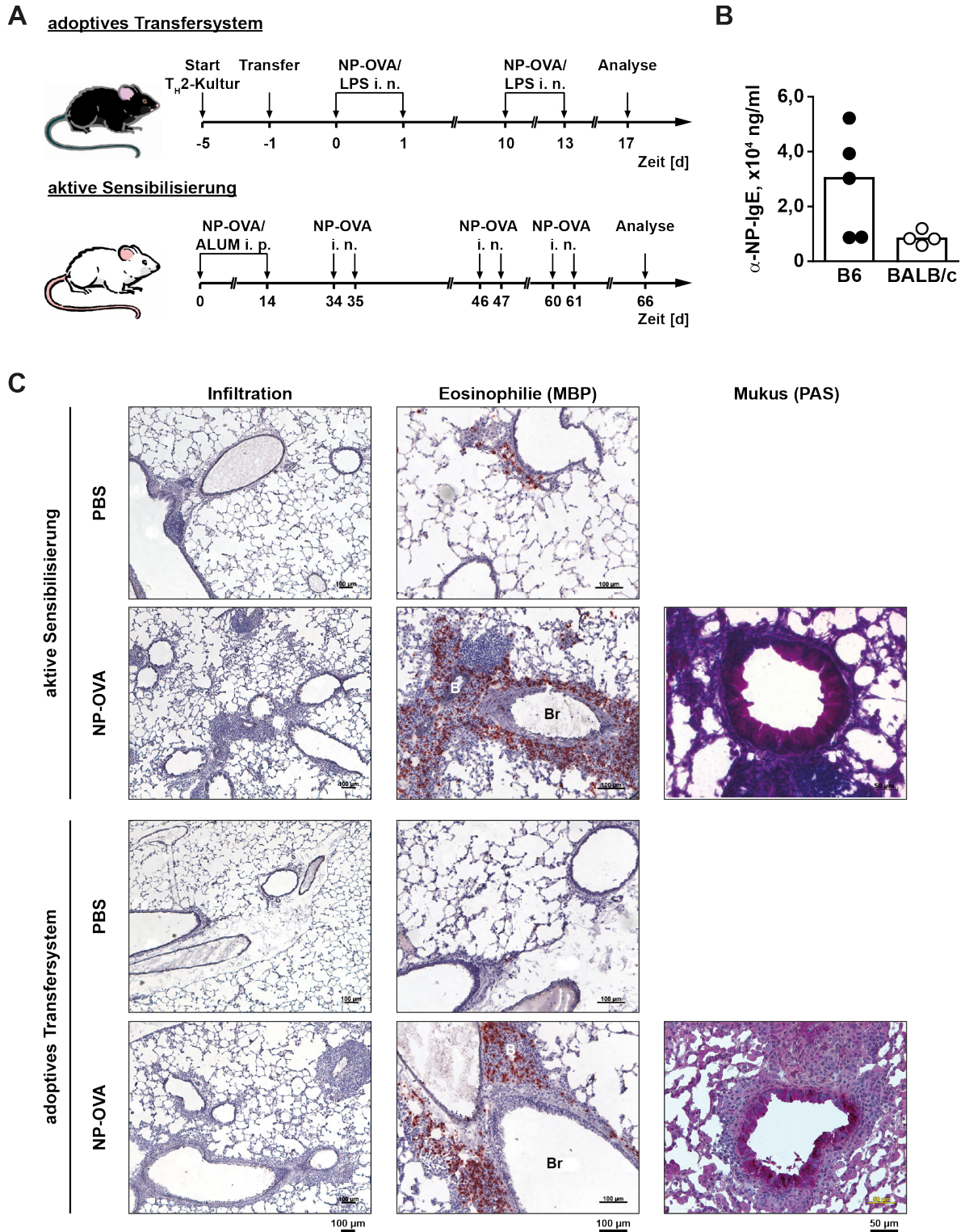


Abbildung 11. Vergleich des neuen Modells mit dem Standardmodell der aktiven Sensibilisierung.

(A) Zeitskalen der beiden Behandlungsprotokolle. Im Falle des adoptiven Transfers wurden je  $2 \times 10^6$  T<sub>H</sub>2-polarisierte T-Zellen und B-Zellen transferiert. Die Immunisierung erfolgte mit 50 µg NP-OVA + 5 µg LPS i. n. an den dargestellten Tagen. Tiere, die nach dem Protokoll der aktiven Sensibilisierung behandelt wurden, erhielten zuerst 50 µg NP-OVA/ALUM i. p.. Anschließend wurden 50 µg lösliches NP-OVA an den angezeigten Tagen i. n. verabreicht. (B) Messung von



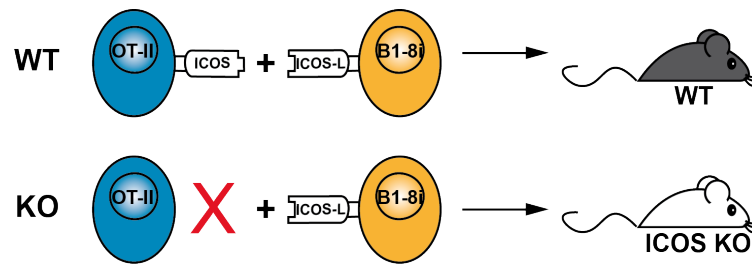
NP-spezifischem IgE im Serum von d15 (B6) und d63 (BALB/c) mittels ELISA, angegeben als absolute Konzentration in ng/ml, wobei  $n = 5$  bei B6 und  $n = 4$  bei BALB/c. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Die Höhe der Balken im Diagramm repräsentiert den Median. (C) histologische Analyse von Gefrierschnitten ( $8 \mu\text{m}$ ) der Lunge von Tieren, die nach dem Standardprotokoll oder dem neu etablierten Protokoll behandelt wurden. Zellkerne (blau) wurden mit Hämatoxylin angefärbt. Eosinophile, die über das *major basic protein* (MBP) detektiert wurden (Mitte), sind als rot-braun gefärbte Zellen zu erkennen. Färbung von Mukopolysacchariden über *Periodic Acid-Schiff* (PAS). Pink angefärbte Zellen entsprechen den schleimproduzierenden Becherzellen. Vergrößerung: 5X (links); 10X (Mitte); 20X (rechts). Die Maßstabsbalken unterhalb der Bilder gelten für alle Bilder der jeweiligen Reihe. Br Bronchus; B Blutgefäß.

## 3.2 Globale Bedeutung von ICOS im entzündeten Gewebe

### 3.2.1 Modellsystem zur Untersuchung der globalen Rolle von ICOS

Zu Beginn der Untersuchungen war von Interesse, welche globale Bedeutung ICOS für die Aktivierung, Expansion und Differenzierung antigenspezifischer T- und besonders B-Zellen hat. Das neu etablierte Modellsystem ermöglichte es dabei, die Vorgänge im Lymphknoten und zeitgleich auch im Gewebe zu analysieren und damit die antigenspezifischen T- und B-Zellen auf ihrer Wanderung vom Startpunkt der Immunantwort aus bis ins Zielorgan zu verfolgen.

Als Empfängertiere dienten u.a. ICOS Knock-out (KO) Mäuse (Özkaynak, 2001), denen es nicht möglich war, ICOS auf ihren T-Zellen zu exprimieren. Mit dem Transfer von OVA-spezifischen T-Zellen, die aus ICOS KO OT-II Spendermäusen stammten, in ICOS KO Empfängermäuse wurde erreicht, dass in der gesamten Maus keine Kostimulation über ICOS erfolgen konnte. Durch den Vergleich mit Wildtypmäusen, denen im Gegenzug OVA-spezifische T-Zellen aus WT OT-II Mäusen transferiert worden sind, wurde es möglich, die globale Rolle von ICOS im neu etablierten Atemwegsentzündungsmodell zu untersuchen. Der Transfer der OVA-spezifischen T-Zellen erfolgte dabei immer mit einem zeitgleichen B-Zell-Transfer (Abbildung 12). Im Folgenden werden diese beiden Gruppen jeweils mit WT oder KO bezeichnet.



**Abbildung 12. Adoptives Transfersystem zur Untersuchung der globalen Effekte von ICOS.**

OVA-spezifische T-Zellen aus WT oder ICOS KO OT-II Mäusen werden zusammen mit NP-spezifischen B-Zellen aus B1-8i Mäusen in WT vs. ICOS KO Empfängermäuse transferiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Gruppen als WT- oder KO-Gruppe bezeichnet.

### 3.2.2 ICOS fördert die Expansion naiver, antigenspezifischer T- und B-Zellen

Aus verschiedenen Studien unter Nutzung unterschiedlicher Modellsysteme ist bekannt, dass sich das Fehlen des induzierbaren Kostimulators ICOS negativ auf die Expansion antigenspezifischer T-Zellen auswirkt (siehe Abschnitt 1.7). Inwieweit ein Einfluss auch auf die Proliferation von antigenspezifischen B-Zellen besteht, wurde bislang nicht untersucht. Weiterhin sollte zu Beginn der Untersuchungen geklärt werden, welchen Einfluss ICOS auf die Expansion von antigenspezifischen T- und B-Zellen im entzündeten Gewebe hat.

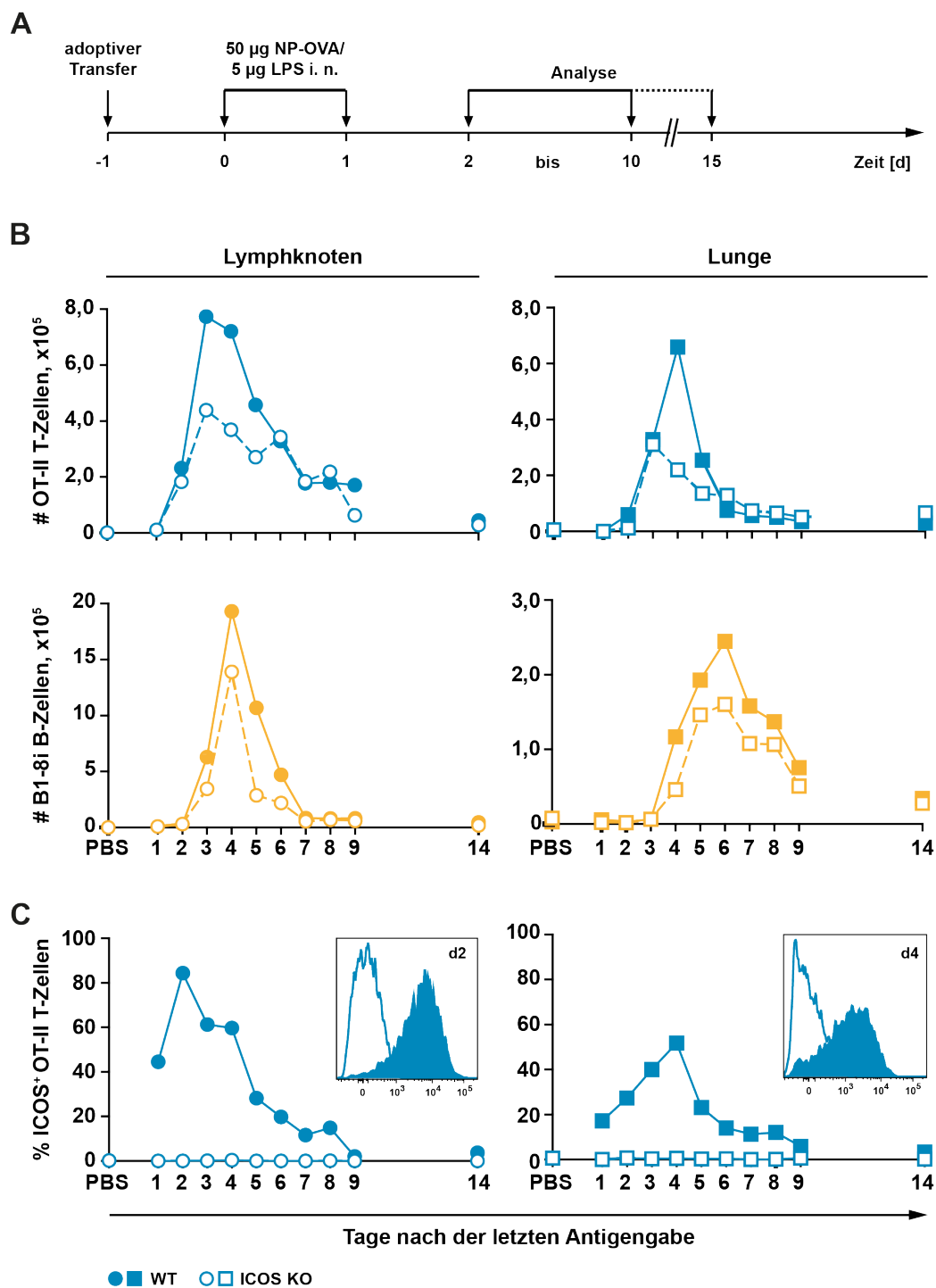
Um einen Einfluss der  $T_H2$ -Polarisierung auszuschließen, wurde diese Untersuchung zunächst unter Verwendung von nicht polarisierten, naiv ( $CD62L^{hoch}$ ) sortierten, OVA-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden je  $2 \times 10^6$  OVA-spezifische T-Zellen mit  $2 \times 10^6$  folliculären, NP-spezifischen B-Zellen unter Nutzung des zuvor beschriebenen Gruppensystems (siehe 3.2.1) in Empfängermäuse transferiert. Nach dem Transfer erhielten die Tiere  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS i. n. verabreicht. Die absoluten Zellzahlen an transgenen T- und B-Zellen in der Lunge und dem tracheobronchealen Lymphknoten wurden ab dem ersten Tag nach der letzten Antigengabe für eng aufeinanderfolgende Tage bestimmt (Abbildung 13A).

Abbildung 13B zeigt die Entwicklung der absoluten Zellzahlen der transgenen T- und B-Zellen über die Zeit. 24 Stunden nach Immunisierung sind im tracheobronchealen Lymphknoten der WT-Mäuse nur sehr wenige antigenspezifische T-Zellen detektierbar und es ist kaum ein Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS) zu sehen. Erst 48 Stunden nach der letzten Antigengabe beginnen die T-Zellen zu expandieren und erreichen an Tag vier und damit 72 Stunden nach der intranasalen Antigenapplikation ihr Expansionsmaximum. Die Kontraktionsphase der Zellen setzt ab Tag fünf ein und erstreckt sich über einen Zeitraum von über fünf Tagen. So ist auch neun Tage nach Immunisierung die Startzellzahl noch immer nicht wieder erreicht. Erst an Tag 15 lassen sich im Lymphknoten kaum noch OVA-spezifische T-Zellen detektieren. OVA-spezifische T-Zellen in der

Lunge erreichen ihr Expansionsmaximum an Tag fünf und damit 24 Stunden später als im Lymphknoten. Die antigenspezifischen B-Zellen folgen den T-Zellen zeitlich, indem sie im Lymphknoten erst 24 Stunden später stark expandieren. Das Expansionsmaximum der B-Zellen wird auch erst an Tag fünf erreicht. Im Lungengewebe dagegen können B-Zellen erst an Tag sieben in maximaler Anzahl detektiert werden und so scheint es auch hier eine zeitliche Verzögerung gegenüber dem Lymphknoten zu geben.

Das Fehlen von ICOS wirkt sich sowohl im Lymphknoten als auch in der Lunge negativ auf die Expansion der T- und B-Zellen aus. So sind in beiden Geweben im Vergleich zum WT im Maximum der Immunantwort stets weniger antigenspezifische T- und B-Zellen detektierbar. Die Analyse eng aufeinanderfolgender Tage zeigt, dass es keine Unterschiede in der Entwicklung der absoluten Zellzahlen der T- und B-Zellen über die Zeit gibt. Expansions- und Kontraktionsphase stimmen zeitlich überein.

Die Analyse der ICOS-Expression auf den transgenen WT-T-Zellen ergab, dass bis zu 80 % aller OVA-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten 48 Stunden nach der letzten Antigengabe ICOS exprimieren (Abbildung 13C). Die Frequenz an ICOS<sup>+</sup> Zellen im Gewebe dagegen ist mit 50 % nicht nur geringer als im Lymphknoten, das Maximum der ICOS-Expression in der Lunge wird im Vergleich zum Lymphknoten zudem auch erst 48 Stunden später erreicht.



**Abbildung 13. Einfluss der ICOS-Kostimulation auf die Expansion naiver, antigenspezifischer T- und B-Zellen.**

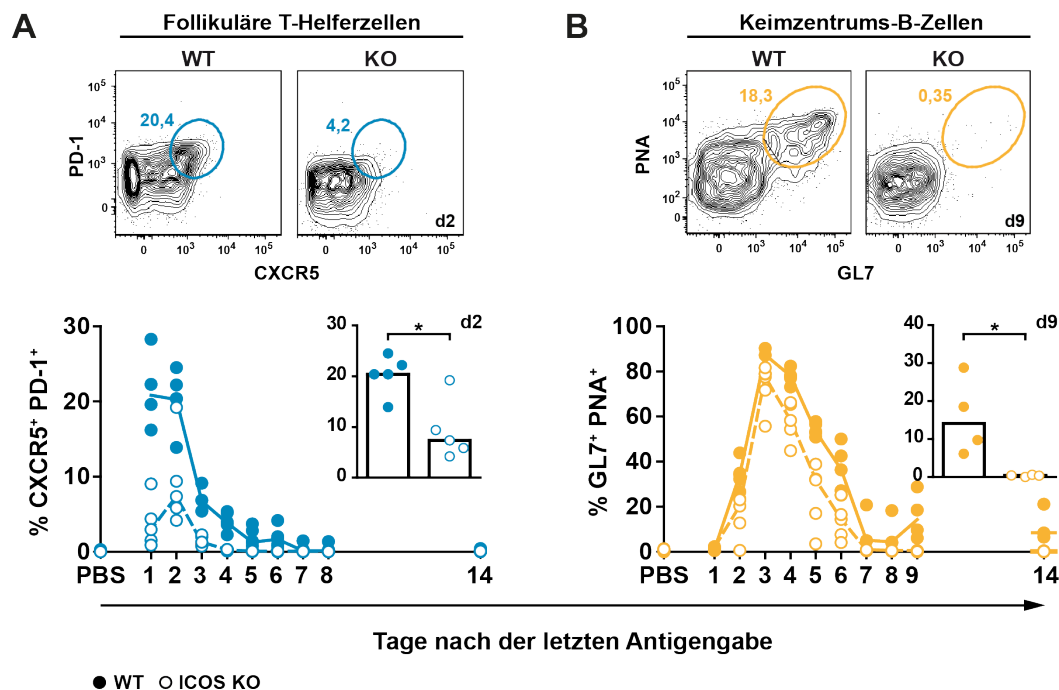
(A) Transfer von  $2 \times 10^6$  WT oder ICOS KO OVA-spezifischen T-Zellen und  $2 \times 10^6$  NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS KO Mäuse. Intranasale Applikation von 50 µg NP-OVA + 5 µg LPS an d0 und d1. Analyse der Lunge und des tracheobronchalen Lymphknotens an den angezeigten Tagen. (B) Entwicklung der absoluten Zellzahlen von T- und B-Zellen im Lymphknoten (links) und in der Lunge (rechts) über die Zeit. (C) Frequenz von ICOS<sup>+</sup> T-Zellen (bezogen auf alle antigenspezifischen T-Zellen) an den angegebenen Zeitpunkten. Repräsentative Färbungen für ICOS auf T-Zellen sind für ausgewählte Tage von jeweils einem Tier gezeigt. Dargestellt ist der Median. Gruppengröße/Analysetag:  $n = 5$ .

### 3.2.3 ICOS ist wichtig für die Differenzierung der T- und B-Zellen zu Follikulären T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen

B-Zellen benötigen, um aktiviert zu werden, die Hilfe sogenannter Follikulärer T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ). Die T-B-Interaktion ist grundlegend dafür, dass sich B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen entwickeln und damit Grundvoraussetzung für die Induktion einer humoralen Immunantwort. Dass ICOS KO Mäuse nach Immunisierung kleinere Keimzentren bilden, die zudem zusätzlich noch in ihrer Frequenz reduziert sind, ist bereits bekannt (Dong, 2001; Tafuri, 2001; McAdam, 2001; Mak, 2003). Inwiefern sich dieser überwiegend histologische Befund jedoch wirklich auf eine beeinträchtigte Differenzierung der B-Zellen hin zu Keimzentrums-B-Zellen zurückführen lässt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Schließlich konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass eine fehlende Kostimulation über ICOS die klonale Expansion der B-Zellen negativ beeinträchtigt (Abbildung 13B). Basierend darauf ist es möglich, dass ICOS die Differenzierung der B-Zellen hin zu Keimzentrums-B-Zellen „direkt“ positiv beeinflusst oder die verminderte Zahl an Keimzentren in ICOS KO Mäusen lediglich auf eine verminderte Expansion der B-Zellen zurückgeführt werden kann. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Differenzierung der antigenspezifischen T- und B-Zellen zu Follikulären T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen auf Einzelzellebene analysiert.

Das zugrunde liegende experimentelle System ist in Abbildung 12 und Abbildung 13A dargestellt. Follikuläre T-Helferzellen können anhand der parallelen Expression von CXCR5 und PD-1 identifiziert werden (Haynes, 2007). Keimzentrums-B-Zellen zeichnen sich durch die langanhaltende Expression von Oberflächenstrukturen aus, die über PNA (*Peanut Agglutinin*; Butcher, 1982) und den Antikörper GL7 detektierbar sind (Cervenak, 2001), wobei die Expression dieser beiden Marker zu frühen Zeitpunkten aktivierungsinduziert erfolgt und nur zu späten Zeitpunkten ein Kriterium zur Beurteilung der Keimzentrumsbildung darstellt. Die durchflusszytometrische Analyse von OVA-spezifischen T-Zellen im tracheobronchealen Lymphknoten zeigt, dass die fehlende Kostimulation über ICOS die Bildung von Follikulären T-Helferzellen signifikant reduziert (Abbildung 14A). Parallel dazu zeigen auch die NP-spezifischen B-Zellen eine verminderte Fähigkeit, zu Keimzentrums-B-Zellen zu differenzieren, wenn ICOS im Gesamtsystem fehlt (Abbildung 14B). Nur diejenigen B-Zellen, die nach Tag sechs noch immer eine Expression von PNA und GL7 aufweisen, werden dabei als Keimzentrums-B-Zellen bezeichnet. Mit fortschreitender Zeit nimmt die Frequenz an  $GL7^+ PNA^+$  B-Zellen im Lymphknoten in beiden Gruppen ab. Während sich jedoch an späten Analysezeitpunkten in den Lymphknoten der WT Mäuse noch immer eine ca. 10%ige Population an Keimzentrums-B-Zellen detektieren lässt, liegt die Frequenz in ICOS KO Mäusen dagegen weit unter 1%. Dies beweist, dass die Kostimulation über ICOS die Differenzierung von B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen auf Einzelzellebene reguliert. Da die Signalgebung über den

Rezeptor (ICOS) und nicht über den Liganden erfolgt, können die Effekte nur indirekter Natur sein und werden vermutlich über die reduzierte Bildung von  $T_{FH}$  und damit eine verminderte T-Zell-Hilfe vermittelt.



**Abbildung 14. Differenzierung von Follikulären T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) und Keimzentrums-B-Zellen (KZB) in Abhängigkeit von ICOS.**

$2 \times 10^6$  OVA-spezifische WT oder ICOS KO T-Zellen und  $2 \times 10^6$  NP-spezifische B-Zellen wurden in WT oder ICOS KO Mäuse transfertiert. Die Immunisierung der Tiere erfolgte intranasal mit  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an d0 + d1. Kontrolltiere erhielten PBS anstelle des Proteinantigens. An den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen des tracheobronchalen Lymphknotens auf das Vorkommen von (A) Follikulären T-Helferzellen und (B) Keimzentrums-B-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind repräsentative Färbungen für CXCR5<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> Follikuläre T-Helferzellen (bezogen auf die Gesamtheit von OVA-TZR-transgenen T-Zellen, definiert als DAPI<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup>) und GL7<sup>+</sup> PNA<sup>+</sup> Keimzentrums-B-Zellen (bezogen auf alle NP-spezifischen B-Zellen, definiert als DAPI<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G/C<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup>). In den Diagrammen repräsentiert jedes Symbol ein Tier, wobei  $n = 3-5$ . Die jeweilige Kurve verläuft durch den Median. Oben rechts sind die Frequenzen von  $T_{FH}$ -Zellen und KZB-Zellen in WT und ICOS KO Mäusen für ausgewählte Zeitpunkte dargestellt. Die Höhe der Balken in den Diagrammen entspricht dem Median. \*  $P < 0,05$  (Mann-Whitney U Test).

### 3.2.4 Die *in vitro* $T_H2$ -Polarisierung der T-Zellen kann den *in vivo* Expansionsdefekt nicht kompensieren

Nachdem ein positiver Effekt von ICOS auf die Expansion naiver T- und B-Zellen festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage, inwiefern T-Effektorzellen noch auf eine Kostimulation über ICOS angewiesen sind. T-Zellen und insbesondere  $T_H2$ -Effektorzellen spielen für die Etablierung

allergischer Immunreaktionen eine wichtige Rolle (siehe Abschnitt 1.5). Die Behandlung von Asthmapatienten wird dabei nicht präventiv möglich sein, da die Sensibilisierung, d.h. der Kontakt mit dem Allergen und der darauffolgenden Bildung allergenspezifischer  $T_H2$ -Effektorzellen, meist schon in der frühen Kindheit erfolgt. Daher ist die Kenntnis über die Relevanz von ICOS für die Expansion von bereits etablierten T-Effektorzellen von großer Bedeutung.

Da T-Zellen in Abwesenheit von ICOS bereits in der frühen Phase der Immunantwort in ihrer Expansion gestört sind (siehe 3.2.2), kann die Relevanz von ICOS auf die (späte) Effektorphase in einem Modellsystem, in dem die ICOS-Signalgebung von Beginn an fehlt, nicht untersucht werden. Aus diesem Grund wurden OVA-spezifische T-Zellen aus WT und ICOS KO OT-II Mäusen *in vitro* in Richtung  $T_H2$  polarisiert. Die Kultivierung erfolgte dabei über einen Zeitraum von 14 Tagen, um zu gewährleisten, dass enddifferenzierte  $T_H2$ -Effektorzellen entstanden sind. Die Aktivierung und  $T_H2$ -Polarisierung der OVA-spezifischen T-Zellen konnte dabei unabhängig von ICOS mit vergleichbarem Erfolg durchgeführt werden, und so sind nach 14 Tagen Kultur über 96 % aller Zellen in der Kultur  $CD4^+ Thy-1.1^+$  und damit antigenspezifisch (Abbildung 15A). Durchschnittlich 35 % aller T-Zellen sind nach *in vitro* Restimulation mit PMA/Ionomycin zur IL-4-Sekretion fähig, 27 % produzieren IL-13 (Abbildung 15A). In beiden Gruppen lässt sich außerdem noch eine ca. 6%ige Population an T-Zellen detektieren, die noch zur IFN- $\gamma$ -Sekretion fähig sind (Abbildung 15A). Je  $1 \times 10^6$  der  $T_H2$ -polarisierten T-Zellen wurden zusammen mit derselben Anzahl an NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS KO Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal, indem zweimalig  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $3 \mu\text{g}$  LPS über die Nase appliziert wurden. An Tag acht und damit sieben Tage nach der letzten Antigengabe wurden Zellen aus der Lunge und dem tracheobronchealen Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert und die absoluten Zellzahlen an antigenspezifischen Zellen in diesen Organen bestimmt. Wie Abbildung 15B (oben) zeigt, können in der ICOS KO Gruppe kaum noch OVA-spezifische T-Zellen gefunden werden. In beiden Organen der KO-Gruppe ist die absolute Zellzahl an  $T_H2$ -Effektorzellen im Vergleich zum WT um den Faktor 11 bis 13 reduziert. Ein ähnliches Bild zeigt sich für die antigenspezifischen B-Zellen, die ebenfalls in Abwesenheit der ICOS-Signalgebung in ihrer Expansion enorm beeinträchtigt sind (Abbildung 15B, unten). Wie bereits erwähnt, sind  $T_H2$ -Zellen wichtig, um die Mobilisierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten zu bewirken (siehe Abschnitt 2.6.7). Aus diesem Grund sollten die Lungen der Tiere auch auf das Vorkommen neutrophiler und insbesondere eosinophiler Granulozyten untersucht werden. Eine Reduktion der Anzahl an  $T_H2$ -Effektorzellen in ICOS KO Mäusen ist mit einer deutlichen Abnahme eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe verbunden (Abbildung 15C). Des Weiteren scheinen eosinophile Granulozyten in ICOS KO Mäusen im Vergleich zu denen im WT weniger stark aktiviert zu sein (gemessen an Siglec-F und CD11c). Neutrophile Granulozyten dagegen wandern

T-Zell-unabhängig ein und sind in den Lungen der Tiere beider Gruppen in vergleichbarer Zellzahl zu finden (Abbildung 15C). ICOS scheint demnach nicht nur für die frühe Expansion naiver T- und B-Zellen wichtig zu sein, sondern wirkt sich auch auf die Expansion von T-Effektorzellen positiv aus. Zeitgleich sind in Abwesenheit von ICOS eosinophile Granulozyten in der Lunge stark in ihrer Zahl reduziert.



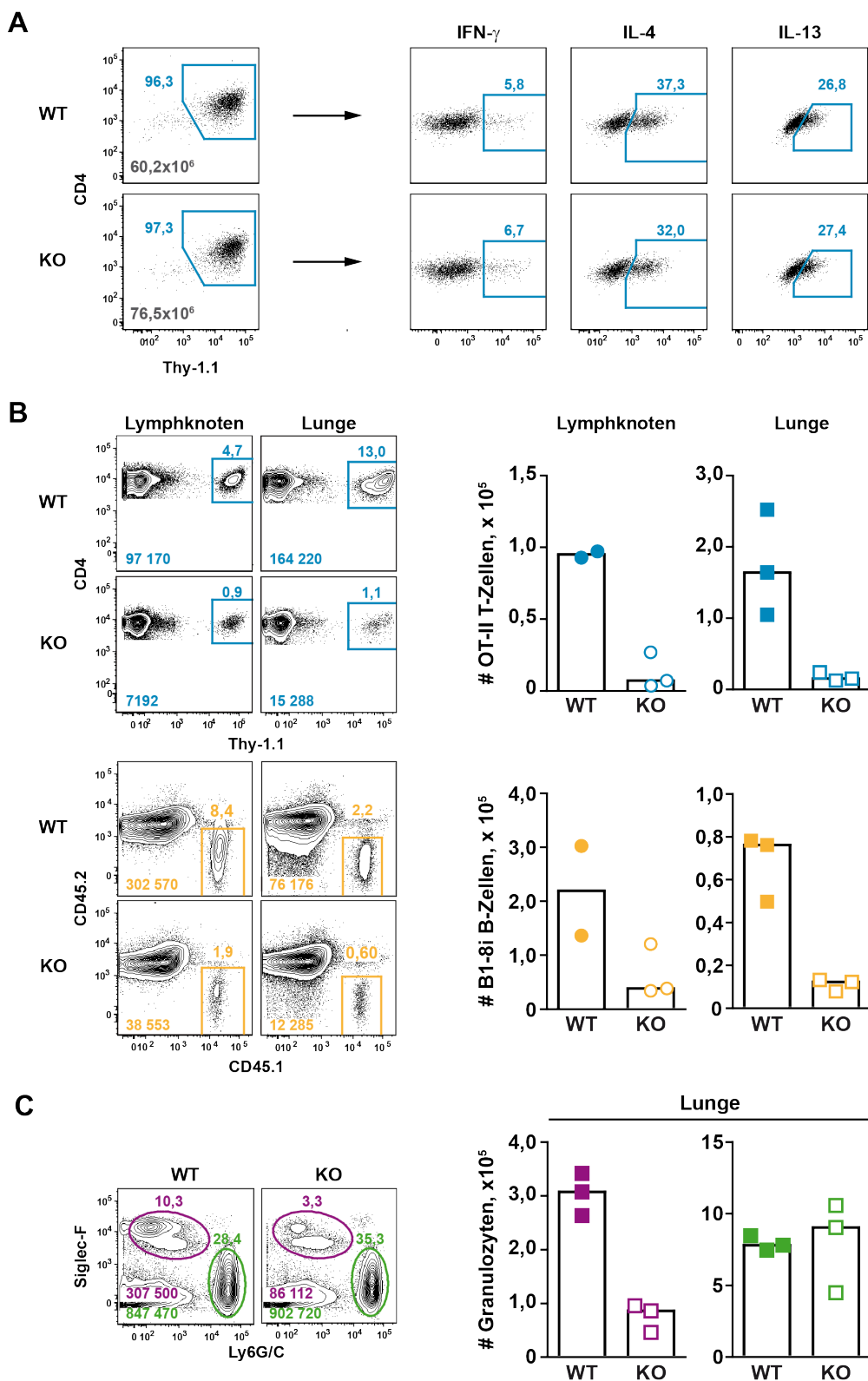


Abbildung 15. Einfluss von ICOS auf die Expansion von T-Effektorzellen.

(A) OVA-spezifische T-Zellen aus WT und ICOS KO OT-II Mäusen wurden *in vitro* für 14 Tage in Richtung T<sub>H</sub>2 polarisiert. Die *in vitro* Stimulation mit PMA/Ionomycin diente dazu, die Frequenz an IL-4-, IL-13- und IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen

zu bestimmen. Die Detektion von Zytokinen erfolgte durch intrazelluläre Färbung. **(B+C)**  $1 \times 10^6$  WT oder ICOS KO OVA-spezifische  $T_H2$ -Effektorzellen wurden mit  $1 \times 10^6$  folliculären, NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS KO Mäuse transferiert. Intranasale Antigengabe von 50  $\mu$ g NP-OVA + 3  $\mu$ g LPS an d0 und d1. Analyse der Lungen und tracheobronchealen Lymphknoten an d8. Die Frequenz an antigenspezifischen T- und B-Zellen, sowie an Granulozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt und basierend darauf die absoluten Zellzahlen der verschiedenen Zellpopulationen berechnet. Gezeigt sind repräsentative Färbungen für OVA-spezifische T-Zellen und NP-spezifische B-Zellen (B), sowie Eosinophile und Neutrophile (C). Jedes Symbol in den Diagrammen repräsentiert ein Tier. Der Median wird durch die Balkenhöhe angegeben. Zahlen innerhalb der FACS-Plots geben entweder die Frequenz oder absolute Zellzahl (unten links) der eingegrenzten Zellpopulation bezogen auf die Elternpopulation an.

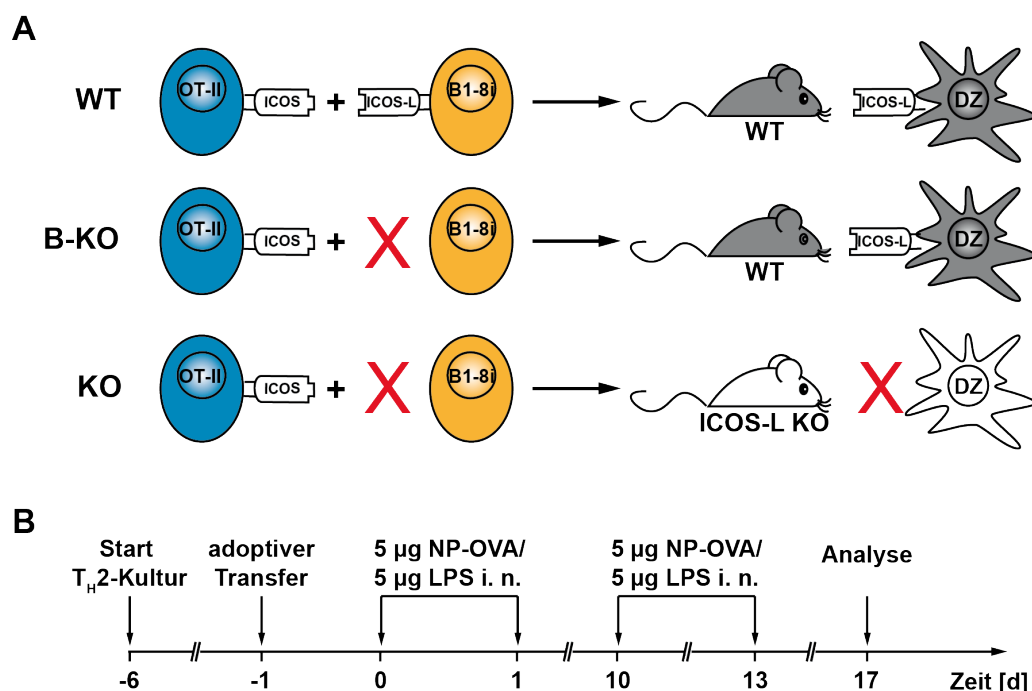
### **3.3 Rolle von ICOS in der Interaktion von T- und B-Zellen im Verlauf einer T-Zell-abhängigen Immunantwort**

#### **3.3.1 Modellsystem zur Untersuchung der Rolle von ICOS in der T-DZ- vs. T-B-Interaktion**

Der induzierbare Kostimulator ICOS wird ausschließlich von T-Zellen exprimiert, die diesen Rezeptor aktivierungsinduziert in innerhalb von 48 Stunden auf ihrer Oberfläche hochregulieren. ICOS-Ligand dagegen ist auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert (siehe Abschnitt 1.2 und 1.7). Beobachtungen bezüglich der Rolle von ICOS, die unter Verwendung von ICOS KO oder ICOS-L KO Mäusen gemacht wurden, können nicht auf die fehlende ICOS-Signalgebung zwischen bestimmten Interaktionspartnern zurückgeführt werden, da die Interaktion von ICOS und ICOS-L im gesamten System fehlt. Um die Frage zu beantworten, welche Relevanz ICOS für die Interaktion von T- und B-Zellen besitzt, brauchten wir ein Modellsystem, in welchem die Signalgebung über ICOS spezifisch zwischen diesen Zellen ausgeschaltet werden kann. Von besonderem Interesse dabei war, welchen Stellenwert ICOS in der T-B-Interaktion im entzündeten Gewebe hat, da beobachtet werden konnte, dass der Transfer  $ICOS^+$  jedoch nicht  $ICOS^-$ ,  $T_H2$ -polarisierter, OVA-spezifischer T-Zellen zu einer Akkumulation von  $B220^+$  B-Zellen im Lungengewebe führt (Löhning, 2003; Beier, 2004).

Um dieses Ziel zu realisieren, wurden B1-8i Mäuse verwendet, deren NP-spezifische B-Zellen kein ICOS-L exprimieren können. Durch den Transfer von ICOS-L KO, NP-spezifischen B-Zellen zusammen mit OVA-spezifischen T-Zellen in WT Mäuse wird ein Zustand erreicht, in dem T-Zellen über ICOS noch mit Dendritischen Zellen interagieren können, nicht aber mit NP-spezifischen B-Zellen (Abbildung 16A, Mitte). Der Transfer derselben Spender T- und B-Zellen in ICOS-L KO Mäuse macht eine Interaktion von ICOS und ICOS-L auch zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen (DZ) unmöglich (Abbildung 16A, unten). Die Verwendung des beschriebenen Transfersystems erlaubt es damit zu untersuchen, welche Rolle ICOS in der Interaktion von T- und B-Zellen hat und

ermöglicht es, die Effekte klar von einer gestörten T-DZ-Interaktion abzugrenzen. Aus bereits genannten Gründen (siehe 3.1.1; 3.1.6; 3.2.4) wurden die OVA-spezifischen T-Zellen vor dem adoptiven Transfer *in vitro* in Richtung  $T_H2$  polarisiert. Die Polarisierung der T-Zellen erfolgte dabei nur für fünf Tage. Zusätzlich wurde die Menge an Antigen erneut titriert (Daten nicht gezeigt) und auf  $5\ \mu\text{g}$  NP-OVA reduziert. Die Generierung antigenlimitierender Bedingungen verbunden mit der mehrfachen Antigengabe sollte helfen, die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen zu steigern (siehe Abschnitt 1.6) und damit die T-B-Interaktion im Gewebe zu fokussieren (Abbildung 16B). Im Folgenden werden die Gruppen jeweils mit WT, B-KO und KO bezeichnet.

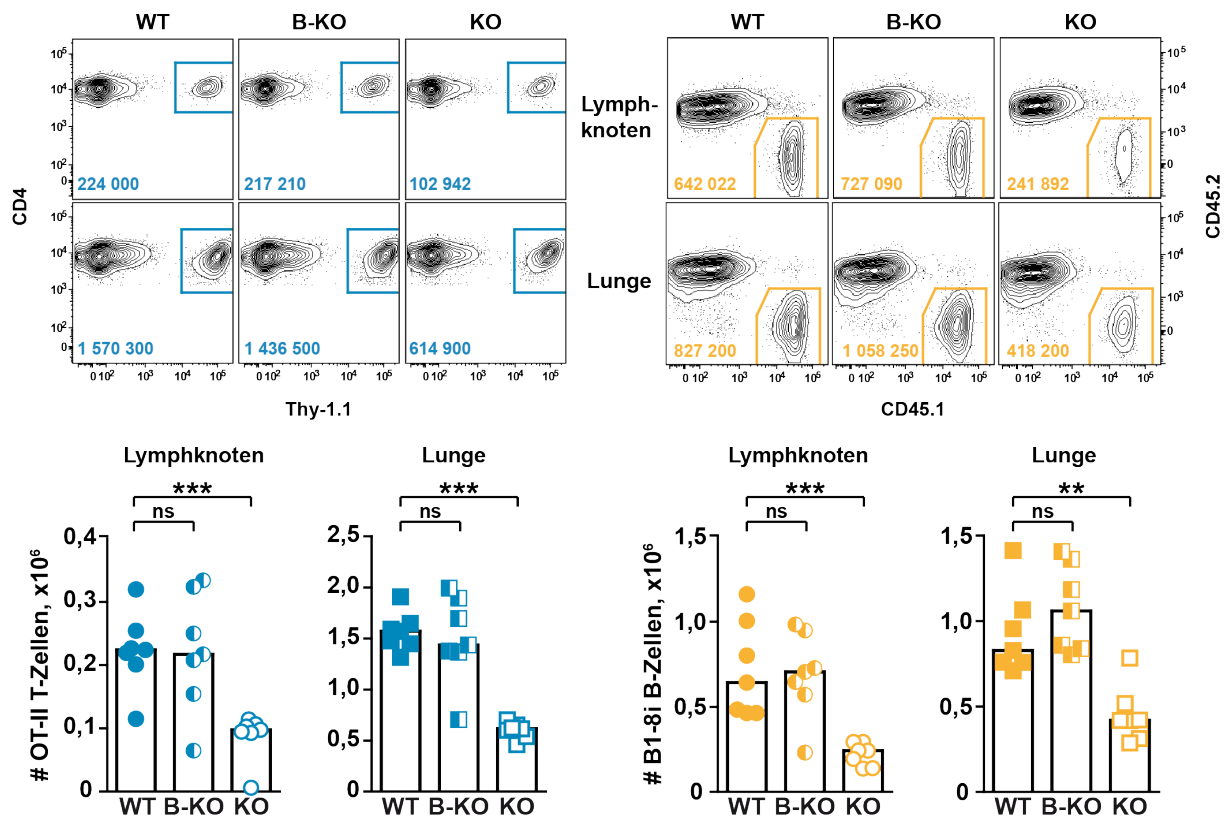


**Abbildung 16. Adoptives Transfersystem zur Untersuchung spezieller Effekte von ICOS.**

(A) OVA-spezifische T-Zellen aus WT OT-II Mäusen werden zusammen mit NP-spezifischen B-Zellen aus WT oder ICOS-L KO B1-8i Mäusen in WT vs. ICOS-L KO Empfängermause transferiert. Dabei erfolgt zuvor eine *in vitro*  $T_H2$ -Polarisierung der OVA-spezifischen T-Zellen. Effekte, die auf der fehlenden ICOS-Signalgebung zwischen T- und B-Zellen beruhen, können von einer gestörten T-DZ-Interaktion abgegrenzt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Gruppen als WT, B-KO oder KO-Gruppe bezeichnet. (B) Behandlungsprotokoll der Mäuse. Nach adoptivem Transfer von je  $2 \times 10^6$  T- und B-Zellen werden die Tiere insgesamt vier Mal mit  $5\ \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5\ \mu\text{g}$  LPS immunisiert. Die Analyse der Lunge und des tracheobronchalen Lymphknotens erfolgt an Tag 17. NP-OVA Nitrophenol-Ovalbumin-Konjugat; DZ Dendritische Zelle; ICOS *inducible costimulator* (induzierbarer Kostimulator); ICOS-L *inducible costimulator ligand* (Ligand für den induzierbaren Kostimulator).

### **3.3.2 Die Expansion der antigenspezifischen T- und B-Zellen ist von ICOS-L auf B-Zellen unabhängig**

Die Untersuchungen unter Verwendung von ICOS KO Mäusen haben gezeigt, dass antigenspezifische T- und B-Zellen in ihrer klonalen Expansion negativ beeinträchtigt sind, wenn ICOS im Gesamtsystem fehlt. Dabei konnte eine Reduktion der absoluten Zellzahlen an antigenspezifischen T- und B-Zellen im Lymphknoten aber auch im entzündeten Gewebe festgestellt werden (siehe 3.2.2 und 3.2.4). Nicht bekannt ist, ob die fehlende Kostimulation über ICOS im Kontakt der T-Zellen mit Dendritischen Zellen oder mit B-Zellen ursächlich für den Expansionsdefekt ist und ob sich die zugrunde liegenden Mechanismen im Lymphknoten und im entzündeten Gewebe gleichen. Um dies zu untersuchen, wurden je  $2 \times 10^6$  OVA-spezifische T-Zellen und dieselbe Zahl an NP-spezifischen B-Zellen in unterschiedliche Empfängermäuse transferiert, wobei das unter 3.3.1 beschriebene experimentelle System Verwendung fand. An Tag 17, drei Tage nach der letzten Antigengabe, wurden Zellen aus der Lunge und dem tracheobronchealen Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert, die Frequenz an antigenspezifischen T- und B-Zellen bestimmt und absolute Zellzahlwerte für beide Lymphozytenpopulationen berechnet. Fehlt ICOS-L nur auf den antigenspezifischen B-Zellen, bleibt die Expansion der transgenen T- und B-Zellen unbeeinträchtigt (Abbildung 17). So lassen sich sowohl im Lymphknoten als auch in der Lunge der B-KO-Gruppe zum WT vergleichbare Zellzahlen an OVA-spezifischen T-Zellen und NP-spezifischen B-Zellen finden. Die Abwesenheit des Liganden auf Dendritischen Zellen dagegen hat eine statistisch signifikante Reduktion der absoluten Zellzahl an transgenen T- und B-Zellen zur Folge, die in beiden Organen beobachtet werden kann (Abbildung 17). Damit wird deutlich, dass die Stärke der T- und B-Zell-Antwort über ICOS im Kontakt der T-Zellen mit Dendritischen Zellen reguliert wird. Die Interaktion von ICOS und ICOS-L zwischen T- und B-Zellen dagegen leistet keinen Beitrag dazu.



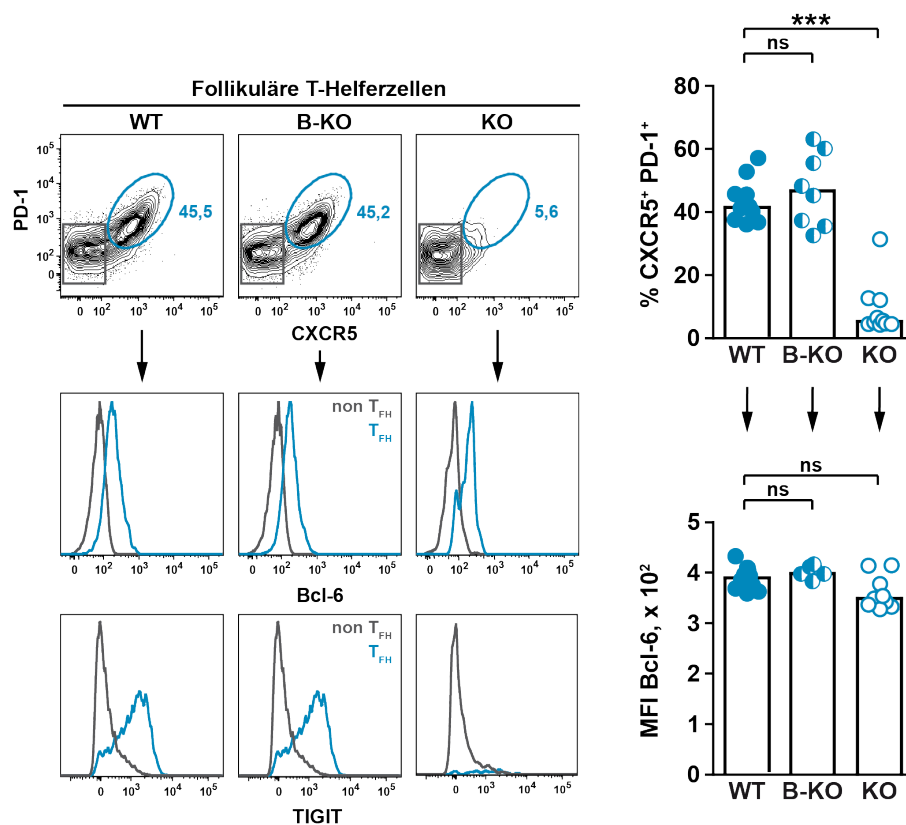
**Abbildung 17. Einfluss von ICOS-L auf die Expansion antigenspezifischer T- und B-Zellen.**

$2 \times 10^6$  OVA-spezifische,  $T_H2$ -polarisierte T-Zellen aus WT OT-II Mäusen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  NP-spezifischen B-Zellen aus WT oder ICOS-L KO B1-8i Mäusen in WT vs. ICOS-L KO Empfängermäuse transferiert. Intranasale Antigengabe von  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an den Tagen 0, 1, 10 und 13. Durchflusszytometrische Analyse von Zellen aus der Lunge und dem Lymphknoten an d17. Gezeigt sind repräsentative Färbungen auf transgene T- und B-Zellen für beide Organe. Die Diagramme zeigen absolute Zellzahlwerte für DAPI<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> T-Zellen und DAPI<sup>-</sup> CD3/CD8/Ly6G<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup> B-Zellen in Lunge und Lymphknoten, wobei jedes Tier durch ein Symbol dargestellt wird ( $n = 7$ ). Die Höhe der Balken in den Diagrammen entspricht dem Median. ns nicht signifikant; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$  (Mann-Whitney U Test).

### 3.3.3 Follikuläre T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen sind nicht auf die T-B-Interaktion über ICOS/ICOS-L angewiesen

Die Bedeutung Follikulärer T-Helferzellen für die Keimzentrumsbildung und humorale Immunantwort wurde bereits angesprochen (siehe 3.2.3). Weiterhin konnte geklärt werden, dass ICOS wichtig ist, damit antigenspezifische T- und B-Zellen zu Follikulären T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen differenzieren können (Abbildung 14). Welchen konkreten Anteil Dendritische Zellen und B-Zellen über ICOS-L an der Generierung Follikulärer T-Helferzellen haben und inwieweit sie sich in dieser Funktion ergänzen oder überschneiden, ist unklar. Eine genauere Analyse der  $T_{FH}$ -Zellentwicklung im Lymphknoten, unter Nutzung des unter 3.3.1 beschriebenen Systems sollte helfen, diese Frage zu

beantworten. Nach adoptivem Transfer und Immunisierung der Tiere wurden Zellen aus dem Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert. Circa 40 % aller OVA-spezifischen T-Zellen in den Lymphknoten der WT Mäuse exprimieren PD-1 und CXCR5 auf einem hohen Niveau (Abbildung 18). Die weiterführende phänotypische Charakterisierung dieser Zellen zeigt, dass nur die CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>hoch</sup> T-Zellen und nicht die CXCR5<sup>-</sup> PD-1<sup>-</sup> T-Zellen den Mastertranskriptionsfaktor der T<sub>FH</sub>-Zellen –Bcl-6 (*B cell lymphoma 6*)– exprimieren (Johnston, 2009; Nurieva, 2009; Yu, 2009) und durch eine Heraufregulation des ebenfalls T<sub>FH</sub>-spezifischen Oberflächenproteins TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*; Seth, 2009) gekennzeichnet sind. Damit können diese Zellen als T<sub>FH</sub>-Zellen identifiziert werden. Die Differenzierung der antigenspezifischen T-Zellen zu T<sub>FH</sub> scheint dabei nicht von der Expression des ICOS-Liganden auf B-Zellen abhängig zu sein, und so lassen sich in den Lymphknoten der B-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ähnlich hohe Frequenzen an CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>hoch</sup> T-Zellen finden. Anders verhält es sich, wenn ICOS-L auf Dendritischen Zellen fehlt. In diesem Fall ist die Bildung Follikulärer T-Helferzellen massiv gestört und es weisen nur noch ca. 5 % der OVA-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten einen T-Helferzell-Phänotyp auf. Bcl-6 und TIGIT werden jedoch auch von diesen Zellen zum WT vergleichbar exprimiert. Dies zeigt, dass die Interaktion zwischen T-Zellen mit Dendritischen Zellen über ICOS einen sehr hohen Stellenwert für die Differenzierung von Follikulären T-Helferzellen einnimmt. Die Beobachtungen, die in ICOS KO Mäusen bezüglich der Bildung von T<sub>FH</sub>-Zellen gemacht werden konnten (siehe 3.2.3), lassen sich damit ausschließlich auf die fehlende Kostimulation über ICOS zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen zurückführen, denn auch die alleinige Expression von ICOS-L auf B-Zellen bei zeitgleicher Abwesenheit auf Dendritischen Zellen konnte den T<sub>FH</sub>-Differenzierungsdefekt nicht kompensieren (Daten nicht gezeigt).



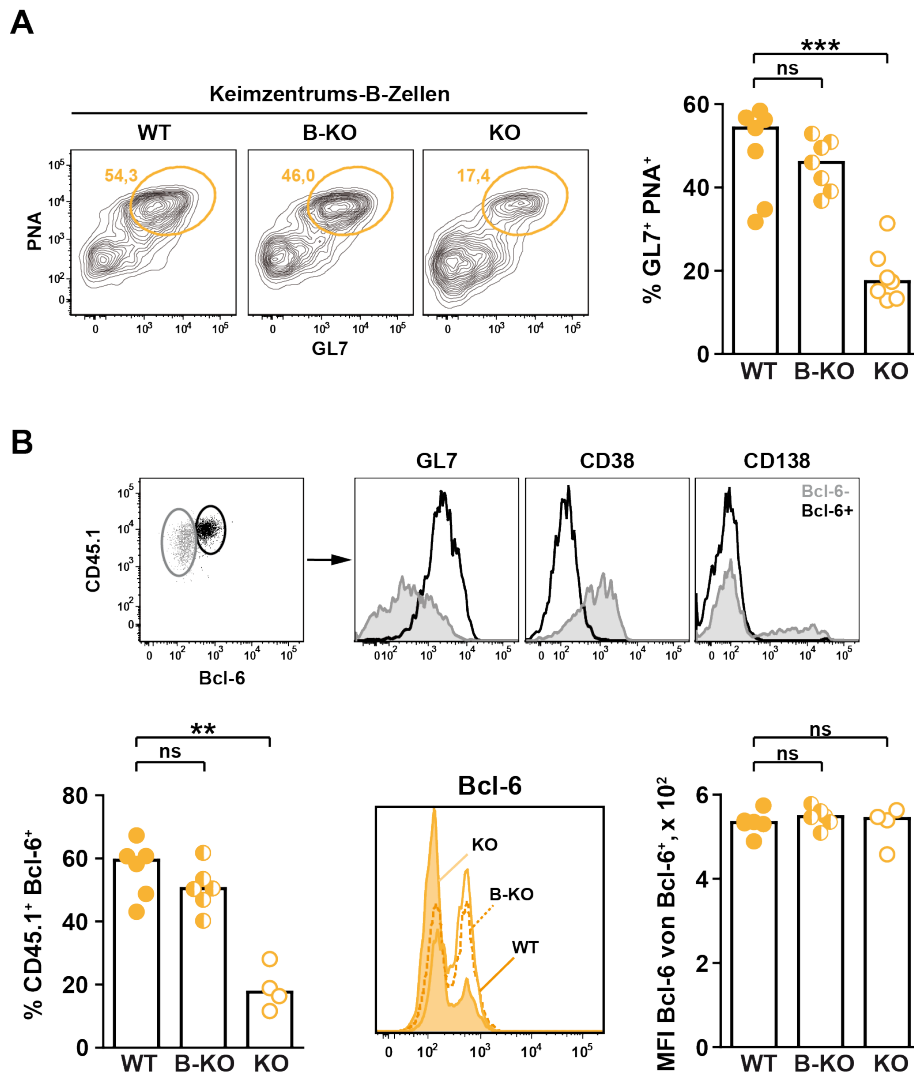
**Abbildung 18. Bedeutung der ICOS-L Expression für die T<sub>FH</sub>-Zellentwicklung.**

$2 \times 10^6$  T<sub>H</sub>2-polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT oder ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS-L KO Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal mit  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer sowie an den Tagen 10 und 13. An Tag 17 wurden die OVA-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten durchflusszytometrisch auf einen T-Helferzell-Phänotyp analysiert. Gezeigt sind repräsentative Färbungen für CXCR5 und PD-1 von jeweils einem Tier jeder Gruppe, wobei die Zahlen die Frequenzen der CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>hoch</sup> Population bezogen auf alle OVA-spezifischen T-Zellen (definiert als DAPI<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup>) wiedergeben. Histogramme zeigen die Expression von Bcl-6 und TIGIT der CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>hoch</sup> (T<sub>FH</sub>) und CXCR5<sup>-</sup> PD-1<sup>-</sup> (non T<sub>FH</sub>) T-Zellen. Jedes Symbol steht für ein Tier, wobei  $n = 10$  für WT und KO und  $n = 8$  für B-KO. Die Höhe der Balken entspricht dem Median. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei. ns nicht signifikant; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$  (Mann-Whitney U Test); MFI mittlere Fluoreszenzintensität; Bcl-6 *B-cell lymphoma 6*; TIGIT *T cell immunoglobulin and ITIM domain*.

Follikuläre T-Helferzellen sind für die Entwicklung von Keimzentrums-B-Zellen essenziell und der induzierbare Kostimulator ICOS ist auf T<sub>FH</sub>-Zellen langanhaltend hoch exprimiert (Burmeister, 2008). Dadurch kann vermutet werden, dass die Wechselwirkung zwischen ICOS/ICOS-L in der T-B-Interaktion für die Differenzierung der B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen eine wesentliche Rolle spielt. Um dies zu überprüfen, wurde neben der Differenzierung der OVA-spezifischen T-Zellen zu T<sub>FH</sub>-Zellen auch die Entwicklung der Keimzentrums-B-Zellen im Lymphknoten, in Abhängigkeit von der ICOS-L-Expression, untersucht. Die Analyse der NP-spezifischen Keimzentrums-B-Zellen ergab, dass ca. 55 % aller antigenspezifischen B-Zellen im Lymphknoten der WT-Gruppe einen

KZB-Phänotyp aufweisen und über GL7 und PNA definiert werden können (Abbildung 19A). Unerwarteterweise blieben B-Zellen, die den Liganden nicht exprimieren können (B-KO), in ihrer Fähigkeit, zu Keimzentrums-B-Zellen zu differenzieren, unbeeinträchtigt. Ist ICOS-L dagegen zusätzlich auch in Dendritischen Zellen ausgeschaltet (KO), ist die Frequenz an PNA<sup>+</sup> GL7<sup>+</sup> NP-spezifischen B-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant reduziert. Die Differenzierung von B-Zellen zu KZB wird auf transkriptioneller Ebene ebenfalls über das Repressorprotein Bcl-6 reguliert, und Keimzentrums-B-Zellen zeichnen sich durch eine sehr hohe Expression des Bcl-6-Proteins aus (Cattoretti, 1995; Allman, 1996). Die Funktionalität der KZB ist somit eng mit der Expression von Bcl-6 verknüpft. Um zu untersuchen, ob die gebildeten Keimzentrums-B-Zellen als solche in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, wenn ICOS-L fehlt, wurde Bcl-6 intrazellulär analysiert. Bcl-6<sup>+</sup> NP-spezifische B-Zellen zeichnen sich in allen drei Gruppen durch die parallele Expression von GL7 und eine zeitgleiche Herabregulation von CD38 (Ridderstad und Tarlinton, 1998) aus. Zusätzlich sind sie CD95<sup>+</sup> (Smith, 1995) und für den Plasmazellmarker CD138 (Sanderson, 1989) negativ (Abbildung 19B, oben und Daten nicht gezeigt). Phänotypisch weisen diese Zellen damit alle Eigenschaften einer Keimzentrums-B-Zelle auf und es besteht eine 100%ige Korrelation zwischen Bcl-6 mit GL7 und PNA. Im Vergleich zur WT-Gruppe ist in der B-KO-Gruppe kein Unterschied in der Frequenz an Bcl-6<sup>+</sup> antigenspezifischen B-Zellen zu erkennen. In der KO-Gruppe hingegen lässt sich im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Reduktion an Bcl-6<sup>+</sup> Zellen beobachten. Unabhängig davon ist bezüglich der Menge an Bcl-6-Protein pro B-Zelle kein Unterschied zwischen den drei Gruppen feststellbar (Abbildung 19B, unten). Die fehlende ICOS-L-Expression auf B-Zellen beeinflusst weder die Differenzierung der B-Zellen zu KZB, noch deren Funktion. Die gestörte T-DZ-Interaktion über ICOS dagegen hat eine stark verminderte Bildung von Keimzentrums-B-Zellen zur Folge. Die wenigen B-Zellen, die sich dennoch zu Keimzentrums-B-Zellen entwickeln, zeigen jedoch eine hohe Expression von Bcl-6 und sind dadurch vermutlich in ihrer Funktion unbeeinträchtigt.





**Abbildung 19. Einfluss der ICOS-L-Expression durch B-Zellen auf die Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen.**

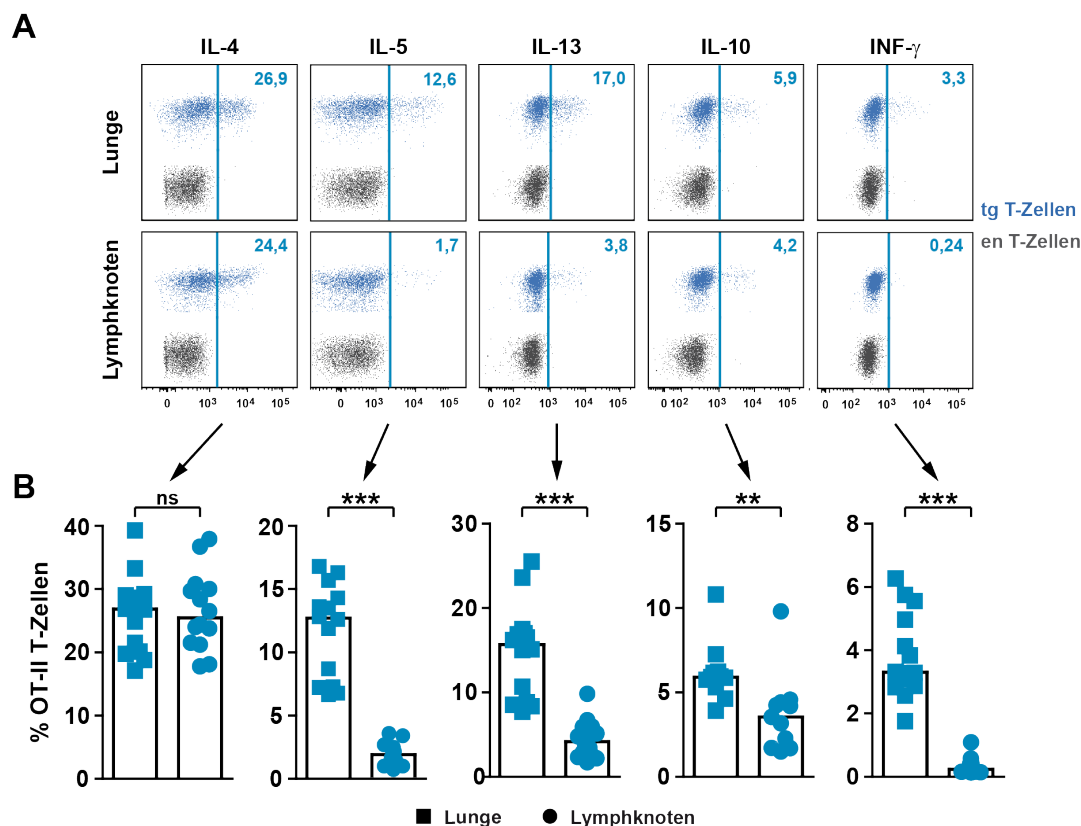
$2 \times 10^6$  T<sub>H</sub>2-polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT oder ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS-L KO Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal mit  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer sowie an den Tagen 10 und 13. An Tag 16 wurden die NP-spezifischen B-Zellen aus dem Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert und die Bildung von Keimzentrums-B-Zellen in Abhängigkeit von der ICOS-L-Expression untersucht. **(A)** Gezeigt sind die Frequenzen an GL7<sup>+</sup> PNA<sup>+</sup> B-Zellen und repräsentative Färbungen für GL7 und PNA von je einem Tier pro Gruppe, wobei die Zahlen innerhalb der FACS-Plots die Frequenzen der GL7<sup>+</sup> PNA<sup>+</sup> B-Zell-Population bezogen auf alle NP-spezifischen B-Zellen (definiert als DAPI<sup>-</sup> CD3/CD8/CD11c/Ly6GC<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup>) wiedergeben. **(B)** Histogramme zeigen exemplarisch die Expression von GL7, CD38 und CD138 der CD45.1<sup>+</sup> Bcl-6<sup>-</sup> und CD45.1<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> NP-spezifischen B-Zellen von einem Tier der WT-Gruppe. Dargestellt sind weiterhin die Frequenzen an CD45.1<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> NP-spezifischen B-Zellen, sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Bcl-6 von allen Bcl-6<sup>+</sup> NP-spezifischen B-Zellen unter den gegebenen Bedingungen. Jedes Symbol in den Diagrammen steht für ein Tier, wobei  $n = 6$  für WT und B-KO und  $n = 4$  für KO. Die Höhe der Balken entspricht dem Median. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei (A) bzw. zwei (B). ns nicht signifikant; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$  (Mann-Whitney U Test).

### 3.3.4 Die Aufrechterhaltung der T<sub>H</sub>2-Effektorfunktionen in der Lunge ist von der Kostimulation über ICOS abhängig

T<sub>H</sub>2-Effektorzellen und insbesondere die durch sie freigesetzten Zytokine sind maßgeblich an der Induktion und Progression der allergischen Immunantwort beteiligt. Therapieansätze, die auf der zielgerichteten Blockade der T<sub>H</sub>2-Effektorzytokine beruhen, finden bereits Anwendung (Leckie, 2000; Hart, 2002; Kips, 2003; Flood-Page, 2007). Die meisten Untersuchungen, die sich mit der Rolle von ICOS auf die Produktion von T-Effektorzytokinen befassen, wurden mehrheitlich in ICOS KO oder ICOS-L KO Mäusen durchgeführt und erlauben dadurch keine detaillierte Analyse der beteiligten ICOS-L tragenden Kooperationspartnerzellen. Zudem stand häufig die Analyse von T-Effektorzellen aus lymphoiden Organen wie der Milz oder dem Lymphknoten im Vordergrund. Antigenerfahrene T-Zellen werden jedoch nach deren Aktivierung im regionalen Lymphknoten ins entzündete Gewebe rekrutiert, in dem sie dann ihre Effektorfunktionen ausüben. Welchen Einfluss ICOS auf die Zytokinfreisetzung durch T-Zellen hat, die in periphere Organe auswandern, ist nicht näher untersucht. Die Kenntnis darüber ist jedoch von großer Bedeutung für die Entwicklung wirkungsvoller Therapiestrategien. Das vorliegende Atemwegsentzündungsmodell erlaubt es nicht nur, die Zytokinsekretion durch antigenspezifische T-Zellen auf Einzelzellebene zu untersuchen, sondern ermöglicht es zeitgleich, Effekte von ICOS im Lymphknoten und in der Lunge genauer zu analysieren.

Um zu erfahren, ob und inwiefern sich OVA-spezifische T-Zellen im Lymphknoten von denen in der Lunge in ihrer Effektorzytokinproduktion unterscheiden, wurden an Tag 17 Zellen aus beiden Organen isoliert und *in vitro* mit OVA<sub>323-339</sub> (OVA-Peptid) restimuliert. Die durchflusszytometrische Analyse auf verschiedene Zytokine ergab, dass nur die antigenspezifischen Zellen in der Lage waren, nach erneuter Restimulation mit OVA-Peptid, Effektorzytokine freizusetzen. Eine Zytokinproduktion durch endogene T-Zellen blieb dagegen vollständig aus (Abbildung 20A). Unter den gemessenen Zytokinen wurden in der Lunge IL-4, IL-5 und IL-13 am stärksten gebildet. Im Vergleich dazu traten IL-10<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen in nur geringen Frequenzen auf. Der Vergleich mit T-Zellen aus dem Lymphknoten macht deutlich, dass es überwiegend T-Effektorzellen im Gewebe sind, die Zytokine sekretieren und so wurden alle gemessenen Zytokine, ausgenommen IL-4, von T-Zellen aus der Lunge stärker gebildet als von denen im Lymphknoten (Abbildung 20B). Wiederum andere Zytokine wie IL-2 und TNF- $\alpha$  wurden von T-Zellen aus beiden Organen vergleichbar stark produziert (Daten nicht gezeigt). Die verstärkte Frequenz an Zytokinproduzenten in der Lunge kann dabei nicht mit einer gesteigerten lokalen Proliferation dieser Zellen im Gewebe begründet werden, wie durch die Analyse der Kurzzeitproliferation über BrdU-Einbau bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass sich T-Effektorzellen in peripheren Geweben wesentlich in ihren Effektorfunktionen von denen in

lymphoiden Organen unterscheiden, und dass die Entscheidung einer T-Zelle, den Lymphknoten zu verlassen, einen bestimmten Differenzierungsgrad dieser T-Zelle voraussetzt.



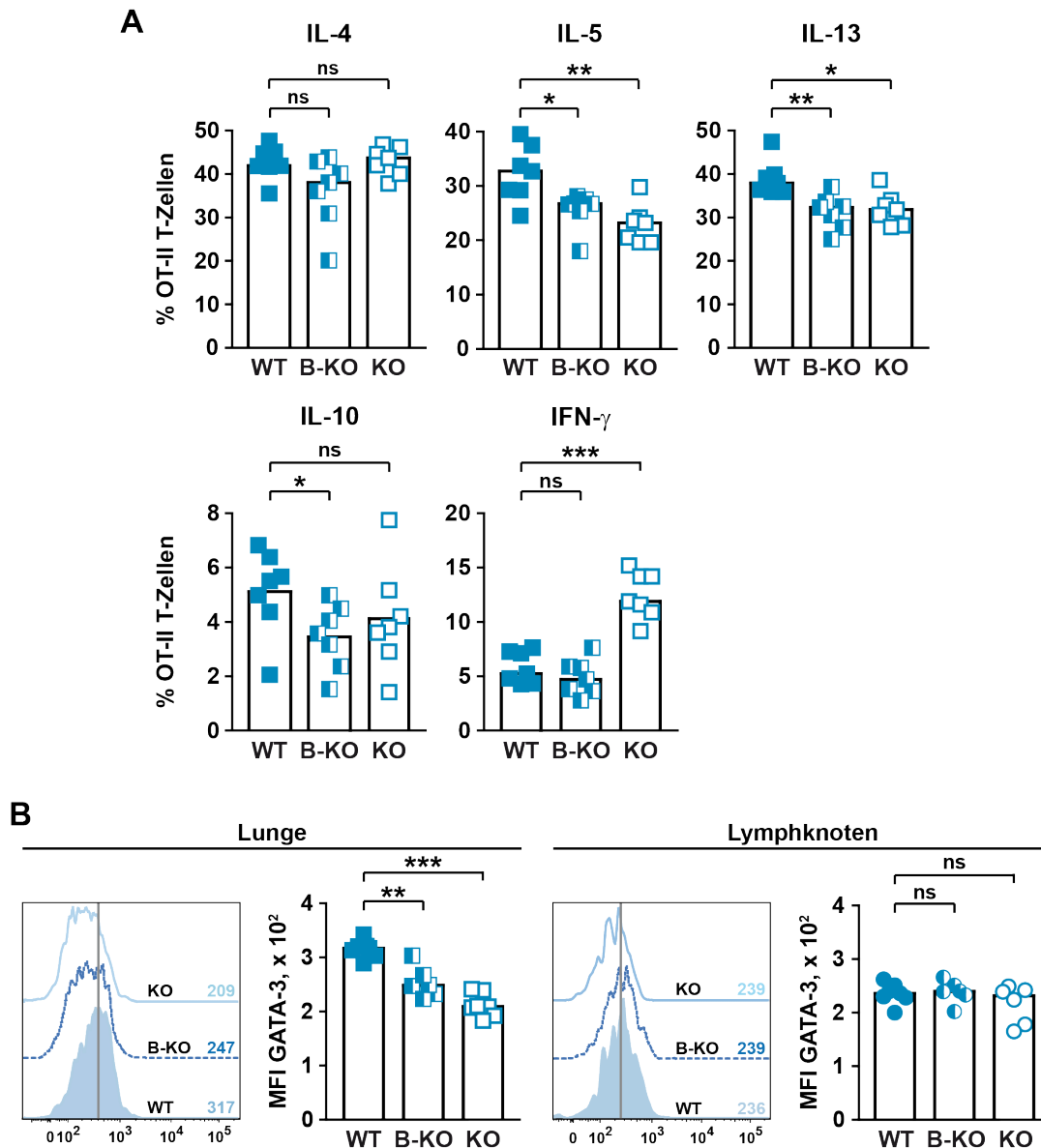
**Abbildung 20. Zytokinproduktion durch T-Effektorzellen aus dem Lymphknoten und der Lunge.**

$2 \times 10^6$  T<sub>H</sub>2- polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  NP-spezifischen B-Zellen in WT Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal mit  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer sowie an den Tagen 10 und 13. An Tag 17 wurden Zellen aus dem Lymphknoten und der Lunge isoliert und mit OVA-Peptid für 4,5 h *in vitro* restimuliert. **(A)** Repräsentative Färbungen auf IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 und IFN- $\gamma$  für OVA-spezifische (blau) und endogene (grau) T-Zellen aus dem Lymphknoten (unten) und der Lunge (oben) sind gezeigt. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Frequenzen an Zytokin<sup>+</sup> T-Zellen bezogen auf alle OVA-spezifischen T-Zellen (definiert als DAPI<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup>). **(B)** vergleichende Darstellung der Frequenzen Zytokin<sup>+</sup>, OVA-spezifischer T-Zellen aus der Lunge und dem Lymphknoten (bezogen auf alle OVA-spezifischen T-Zellen). Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, wobei n = 15. Der Median wird durch die Balkenhöhe angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei. ns nicht signifikant; \*\*\* P < 0,001; \*\* P < 0,01 (Mann-Whitney U Test).

Bestimmte Zytokine werden also überwiegend von T-Effektorzellen im Gewebe produziert. Aber welche Relevanz besitzt nun eigentlich die Kostimulation über ICOS für die Produktion von Effektorzytokinen? Die Tatsache, dass T-Gedächtniszellen durch eine langanhaltende Expression des ICOS-Rezeptors gekennzeichnet sind (Burmeister, 2008), lässt vermuten, dass ICOS auch für bereits antigenerfahrene Zellen noch immer von Bedeutung ist. Unter Verwendung des unter 3.3.1

beschriebenen experimentellen Systems sollte diese Fragestellung näher untersucht werden. Um zu erfahren, welche Zytokine in welchem Maße in der konkreten Immunantwort gegen Ovalbumin gebildet werden, wurden an Tag 17 isolierte Lungenzellen *in vitro* mit OVA-Peptid restimuliert. Nachfolgend konnten verschiedene Zytokine intrazellulär angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert werden. Abbildung 21A zeigt, dass die Mehrheit der OVA-spezifischen T-Zellen aus der WT-Gruppe die T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 produziert. IFN- $\gamma$  und IL-10 dagegen werden von weitaus weniger T-Effektorzellen exprimiert (Abbildung 21A). Fehlt ICOS-L auf den NP-spezifischen B-Zellen (B-KO), ist eine Reduktion der Frequenz an IL-5, IL-13 und IL-10 produzierenden T-Zellen erkennbar. Gleiches gilt, wenn ICOS-L auf Dendritischen Zellen fehlt (KO-Gruppe), wenn auch die Reduktion an IL-10<sup>+</sup> T-Zellen statistisch nicht signifikant ist. Die fehlende Kostimulation über ICOS zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen lässt zudem eine verstärkte Differenzierung der OVA-spezifischen T-Zellen hin zu IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen beobachten, die nicht sichtbar ist, wenn nur B-Zellen ICOS-L nicht exprimieren. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der erhöhten IFN- $\gamma$ -Sekretion ließen sich bereits unter Verwendung von ICOS KO Mäusen erzielen (Daten nicht gezeigt). IL-4 dagegen wird unabhängig von der Kostimulation über ICOS/ICOS-L in allen drei Gruppen vergleichbar stark gebildet.

GATA-3 gilt als Mastertranskriptionsfaktor für T<sub>H</sub>2-Zellen und induziert die Produktion von IL-5 und IL-13 in diesen Zellen (siehe Abschnitt 1.3.2). Initial wird GATA-3 durch IL-4 induziert, was während der *in vitro* Polarisierung exogen bereitgestellt wurde. Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen der verminderten Sekretion von IL-5 und IL-13 in den beiden KO-Gruppen mit der Expression von GATA-3 besteht, sollte die Expression von GATA-3 in OVA-spezifischen T-Zellen analysiert werden. Grundsätzlich lässt sich in den antigenspezifischen T-Zellen aller drei Gruppen eine GATA-3-Expression nachweisen, die jedoch in T-Zellen des Lungengewebes in beiden KO-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant vermindert ist (Abbildung 21B). Diese Reduktion ist dabei in der KO-Gruppe im Vergleich zur B-KO-Gruppe nochmals stärker ausgeprägt (Abbildung 21B, unten links). Dagegen wird GATA-3 von T-Zellen aus dem Lymphknoten in allen drei Gruppen vergleichbar stark gebildet (Abbildung 21B, unten rechts). Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Kostimulation über ICOS wichtig für die Aufrechterhaltung der T<sub>H</sub>2-Effektorfunktionen im entzündeten Gewebe ist, wobei Dendritische Zellen und B-Zellen als ICOS-L tragende, antigenpräsentierende Zellen einen gemeinsamen Beitrag dazu leisten.

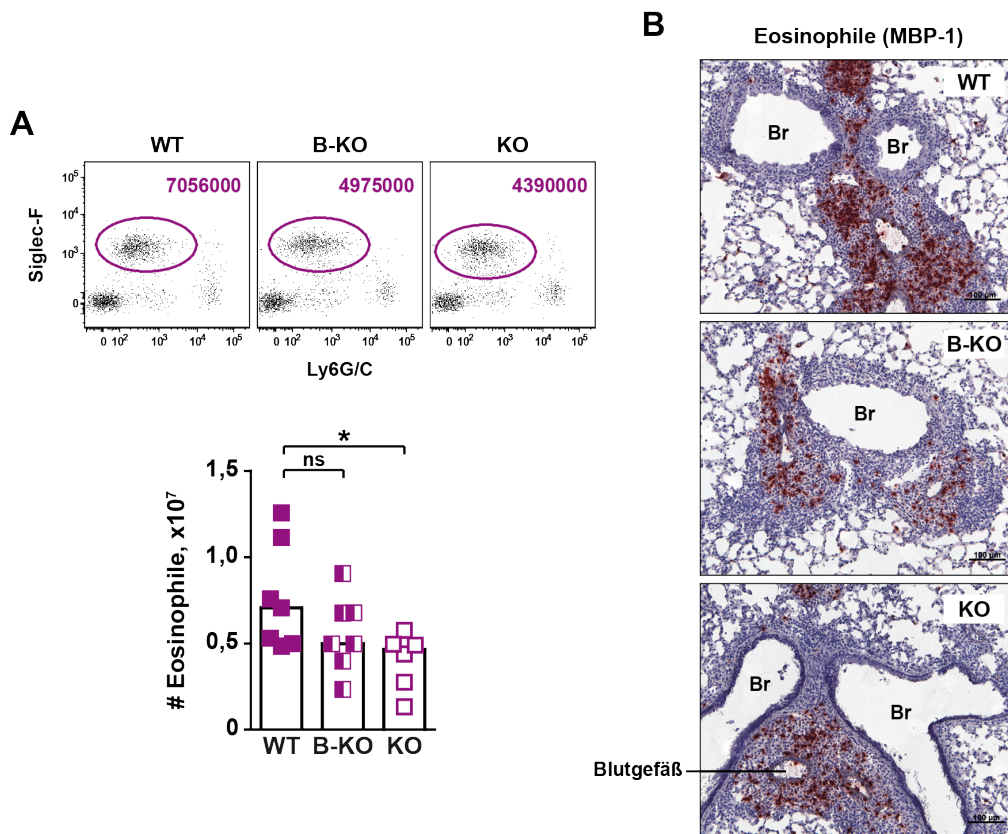


**Abbildung 21. Relevanz von ICOS-L für  $T_H2$ -Effektorfunktionen.**

$2 \times 10^6$   $T_H2$ -polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT oder ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS-L KO Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal mit  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer sowie an den Tagen 10 und 13. An Tag 17 wurden Zellen aus der Lunge isoliert und mit OVA-Peptid für 4,5 h *in vitro* restimuliert. **(A)** Frequenzen an Zytokin<sup>+</sup> T-Zellen bezogen auf alle OVA-spezifischen T-Zellen (definiert als DAPI<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup>). **(B)** intrazelluläre Färbung auf GATA-3 in OVA-spezifischen T-Zellen der Lunge (links) und des Lymphknotens (rechts). Die Histogramme zeigen repräsentative Färbungen für GATA-3 von jeweils einem Tier pro Gruppe, wobei die angegebenen Zahlenwerte die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für GATA-3 repräsentieren. Der graue Strich markiert die MFI von GATA-3 des Wildtyps. Diagramme zeigen die MFI für GATA-3 von allen OVA-spezifischen T-Zellen. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, wobei  $n = 6$ . Die Höhe der Balken entspricht dem Median. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei. ns nicht signifikant; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$  (Mann-Whitney U Test).

Über die Ausschüttung von Zytokinen über T-Zellen u.a. ihre Funktion als T-Effektorzellen aus und so dienen Zytokine den T-Zellen dazu, mit anderen Zellen zu kommunizieren. Wie bereits an früherer Stelle erwähnt, stimuliert IL-5 das Wachstum und die Differenzierung von eosinophilen Granulozyten und so treten Eosinophile im Lungengewebe beim allergischen Asthma in hoher Anzahl auf (siehe Abschnitt 1.5). Durch die Freisetzung hochtoxischer Granulaproteine verursachen sie beträchtliche Schäden im Gewebe, was Strukturveränderungen in der Lunge nach sich zieht (*airway remodelling*). Eine Minderung der IL-5-Ausschüttung durch T<sub>H</sub>2-Zellen könnte daher zu einer verbesserten Symptomatik bei Asthmapatienten führen. Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob die verminderte IL-5-Freisetzung einen direkten Effekt auf die Anzahl an eosinophilen Granulozyten hat.

Unter Nutzung des Standardmodells (siehe 3.3.1) wurden an Tag 17 Lungenzellen isoliert und die Frequenz an eosinophilen Granulozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Wie Abbildung 22A zeigt, hat die Abwesenheit von ICOS-L auf B-Zellen, aber auch Dendritischen Zellen, einen verminderten Einstrom von eosinophilen Granulozyten ins Lungengewebe zur Folge. Der Unterschied in der B-KO-Gruppe ist zwar nicht statistisch signifikant, ließ sich aber mehrfach reproduzieren. Auch histologisch können in beiden Knock-out Gruppen weniger Eosinophile im Lungengewebe gefunden werden, wie anhand der Anzahl an MBP (*major basic protein*)<sup>+</sup> Zellen erkennbar ist (Abbildung 22B). Die Menge an freigesetztem IL-5 korreliert somit mit der Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Gewebe. Damit wirkt sich die fehlende Kostimulation über ICOS indirekt auf die Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Lungengewebe aus.



**Abbildung 22. Einfluss von ICOS-L auf die Zahl eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe.**

$2 \times 10^6$   $T_H2$ -polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT oder ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS-L KO Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal mit  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer sowie an den Tagen 10 und 13. Durchflusszytometrische (A) und histologische (B) Analyse auf eosinophile Granulozyten an Tag 17. (A) repräsentative Färbung von eosinophilen Granulozyten (definiert als  $\text{DAPI}^- \text{CD3}^- \text{B220}^- \text{CD11b}^- \text{Siglec-F}^+ \text{Ly6G}^+$ ) im Lungengewebe (oben). Angegeben sind die absoluten Zellzahlen an eosinophilen Granulozyten der entsprechenden Probe. Das Diagramm zeigt die absoluten Zellzahlen an Eosinophilen aller Tiere einer Gruppe. Jedes Symbol steht für ein Tier, wobei  $n = 7$ . Die Höhe der Balken entspricht dem Median. ns nicht signifikant; \*  $P < 0,05$  (Mann-Whitney U Test). (B) histologische Analyse von Gefrierschnitten ( $8 \mu\text{m}$ ) der Lunge. Eosinophile Granulozyten wurden über das *major basic protein* (MBP) angefärbt und sind als rot-braun gefärbte Zellen zu erkennen. Hämatoxylin diente zur Anfärbung der Zellkerne (blau). Br Bronchus.

### 3.3.5 Plasmazellen entwickeln sich unabhängig von der Kostimulation über ICOS

Das Wesen der humoralen Immunantwort liegt in der Produktion antigenspezifischer, hochaffiner Antikörper, die im Falle einer Infektion dazu dienen, den Erreger wirkungsvoll zu bekämpfen. Bei allergischen Reaktionen jedoch führen sie dazu, dass eine krankmachende Überempfindlichkeit gegen eigentlich harmlose, nicht infektiöse Stoffe ausgelöst wird. Dabei sind es insbesondere Antikörper vom IgE-Isotyp, die von B-Zellen während allergischer Immunreaktionen gebildet werden (siehe Abschnitt 1.5). Initiale Studien zur Rolle von ICOS in der T-B-Interaktion postulierten, dass die Kostimulation über ICOS wichtig ist, damit B-Zellen einen optimalen Isotypwechsel durchführen

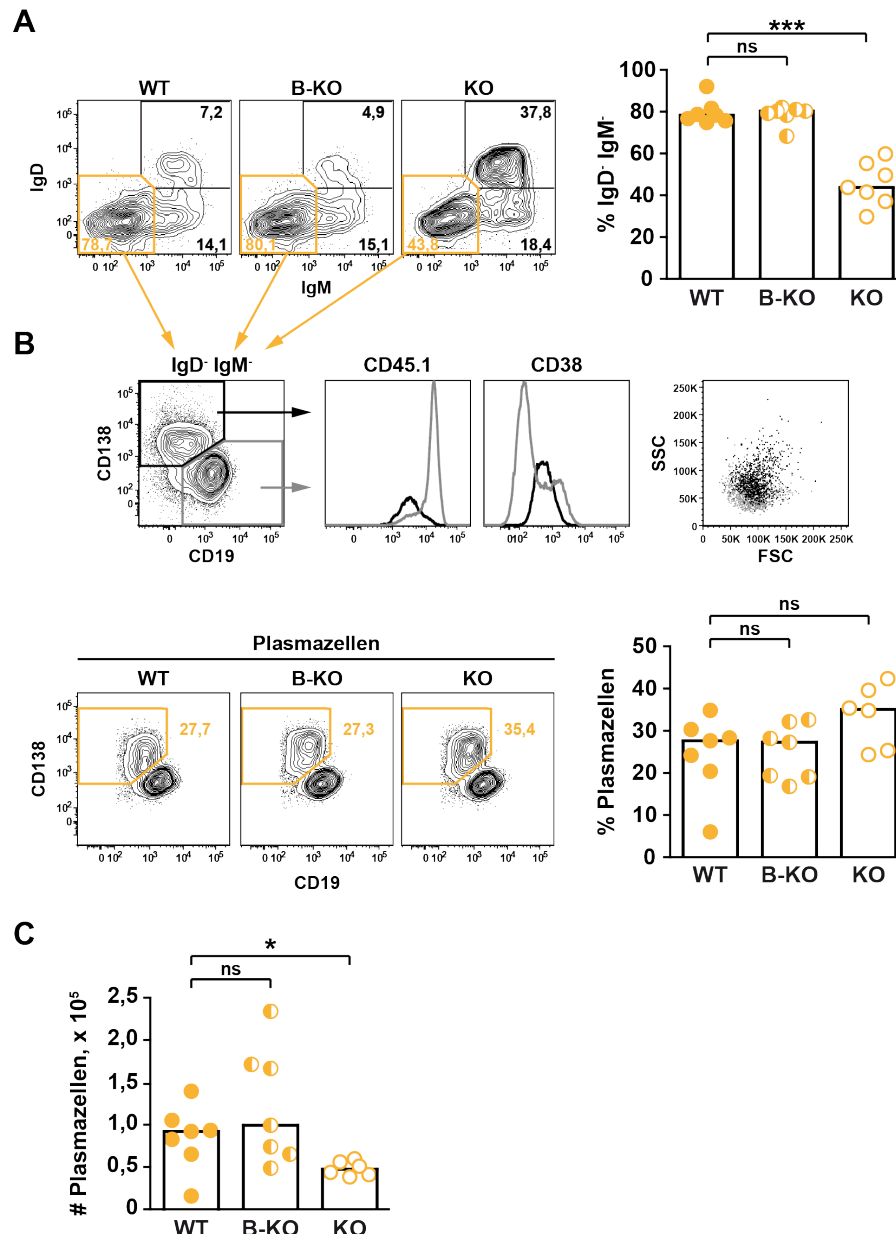
können (Tafari, 2001). Gestützt wird diese Aussage überwiegend darauf, dass ICOS KO oder ICOS-L KO Tiere verminderte Immunglobulinspiegel im Serum aufweisen (Tafari, 2001). Ursachen für geringere Serumimmunglobulinspiegel können jedoch vielfältig sein. So wurde nicht geklärt, ob die Differenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder lediglich ein Defekt im Isotypwechsel ursächlich für die reduzierten Serumimmunglobulinspiegel ist. Zudem können die Effekte nicht auf die fehlende Kostimulation über ICOS zwischen T- und B-Zellen zurückgeführt werden, da durch Verwendung von ICOS KO oder ICOS-L KO Mäusen bereits die initiale T-DZ-Interaktion über ICOS fehlt. Dies zieht schwerwiegende Defekte nach sich, wie in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte (siehe 3.3.2; 3.3.3; 3.3.4). Aus diesem Grund sollte die Differenzierung der NP-spezifischen B-Zellen zu Plasmazellen sowie der Isotypwechsel unter Zuhilfenahme des unter 3.3.1 beschriebenen experimentellen Systems auf Einzelzellebene untersucht werden.

Naive B-Zellen zeichnen sich durch die parallele Expression von Oberflächen-IgD und -IgM aus, die sie nach Aktivierung zugunsten anderer Immunglobulinisotypen verlieren. Die Analyse dieser beiden Marker kann daher genutzt werden, um den Aktivierungsstatus der B-Zelle zu bestimmen. Wie Abbildung 23A zeigt, werden NP-spezifische B-Zellen im Lymphknoten signifikant schlechter aktiviert, wenn die Kostimulation über ICOS in der frühen T-DZ-Interaktion fehlt und so weisen noch ca. 38 % aller NP-spezifischen B-Zellen in den Lymphknoten der KO-Gruppe im Vergleich zu 7 % im WT einen naiven Phänotyp auf. Dagegen scheint die Abwesenheit des Liganden nur auf den NP-spezifischen B-Zellen keine negative Auswirkung auf den Aktivierungsstatus der B-Zelle zu haben und 80 % der B-Zellen sind aktiviert.

Die Differenzierung zu Plasmazellen kann durchflusszytometrisch über bestimmte Marker verfolgt werden. Im Unterschied zu B-Gedächtniszellen exprimieren Plasmazellen CD138 (Sanderson, 1989) und weisen nur intermediäre Level an CD19 auf (Abbildung 23B). Die weiterführende Analyse ergab, dass sämtliche  $CD138^+ CD19^{int}$  B-Zellen in dem vorliegenden Modellsystem durch die Herabregulation des kongenen Markers CD45.1 gekennzeichnet sind und CD38 auf mittlerem Niveau exprimieren. Im Vergleich zu  $CD138^-$  B-Zellen sind Plasmazellen zudem größer, erkennbar an der Zunahme von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC). Vergleicht man die drei Gruppen im Hinblick auf die Frequenz an gebildeten NP-spezifischen Plasmazellen, sind keine Unterschiede feststellbar (Abbildung 23B, unten). Innerhalb der aktivierten und damit  $IgD^- IgM^-$  B-Zell-Population entwickelten sich durchschnittlich 30 % aller NP-spezifischen B-Zellen zu Plasmazellen. Dabei ist nicht von Bedeutung, ob es zur Kostimulation über ICOS zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen bzw. T-Zellen und B-Zellen kommt. Im Gegenteil, fehlt die ICOS-Signalgebung in der frühen T-DZ-Interaktion, entwickeln sich tendenziell sogar mehr antigenspezifische B-Zellen zu Plasmazellen (Abbildung 23B, rechts). Im Lungengewebe ließen sich ebenfalls B-Zellen finden, die



einen Plasmazell-Phänotyp aufweisen (Daten nicht gezeigt). Auch hier waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar. Im Lymphknoten wird die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen auf Einzelzellebene nicht durch ICOS beeinflusst. Die Unterschiede in der absoluten Zellzahl an NP-spezifischen Plasmazellen, die dennoch in der KO-Gruppe zu beobachten sind (Abbildung 23C), resultieren aus der verminderten klonalen Expansion der B-Zellen (siehe 3.3.2) verbunden mit der insgesamt schlechteren Aktivierung dieser Zellen, wenn ICOS-L auf Dendritischen Zellen fehlt.



**Abbildung 23. Einfluss der ICOS/ICOS-L-Interaktion auf die Differenzierung von Plasmazellen.**

$2 \times 10^6$   $T_H2$ -polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT oder ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS-L KO Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal mit  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS

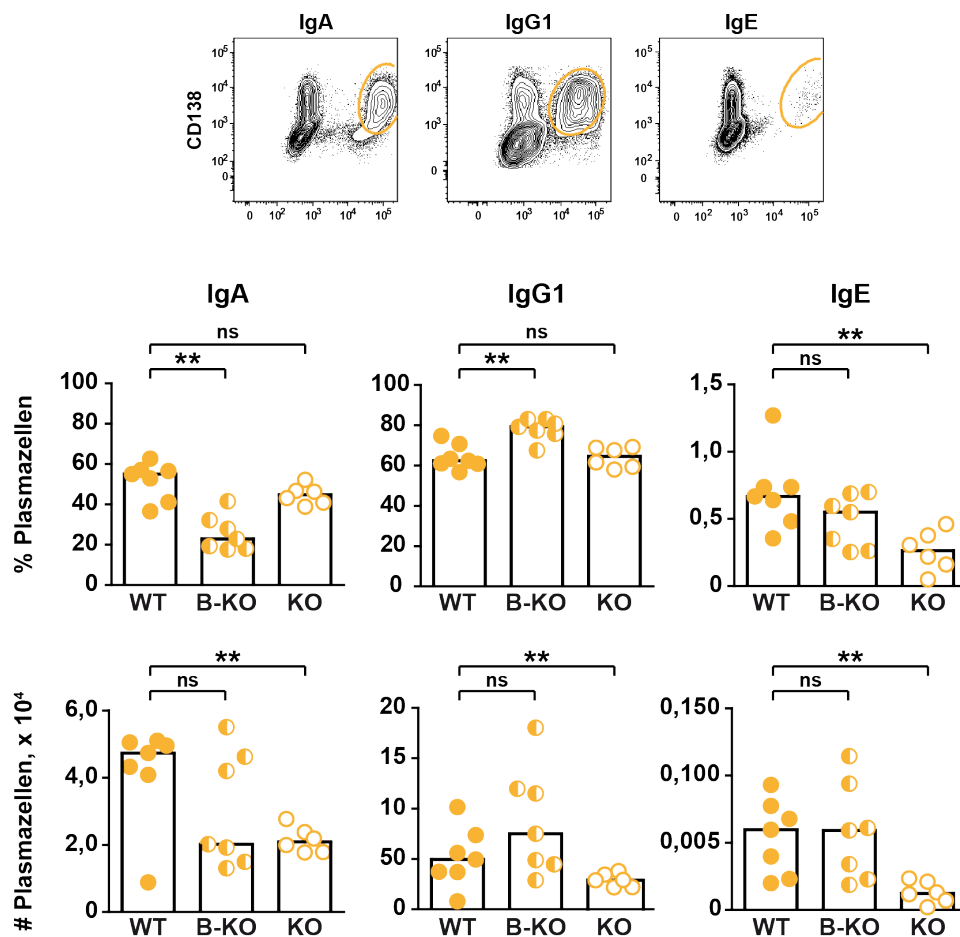
an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer sowie an den Tagen 10 und 13. An Tag 17 wurden Zellen aus dem Lymphknoten isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** Analyse des Aktivierungsstatus der NP-spezifischen B-Zellen anhand der Oberflächenexpression von IgD und IgM. Gezeigt sind repräsentative Färbungen für IgD und IgM auf NP-spezifischen B-Zellen für jeweils ein Tier pro Gruppe (links) sowie die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aller Tiere der jeweiligen Gruppe (rechts,  $n = 7$ ). Zahlen innerhalb der Plots geben die Frequenz der jeweils eingegrenzten Population bezogen auf alle NP-spezifischen B-Zellen an (definiert als DAPI<sup>+</sup> CD3/CD8/CD11c/Ly6G<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup>). **(B)** durchflusszytometrische Analyse auf Plasmazellen. oben: Phänotypische Charakterisierung der Plasmazellen (definiert als IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup> CD19<sup>int</sup> CD138<sup>+</sup>), unten: repräsentative Färbungen für Plasmazellen von jeweils einem Tier pro Gruppe, das Diagramm zeigt alle Tiere der jeweils angezeigten Gruppe, wobei  $n = 7$ . **(C)** absolute Zellzahlwerte von Plasmazellen im Lymphknoten, wobei jedes Tier durch ein Symbol repräsentiert wird. Die Balkenhöhe entspricht dem Median. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei. ns nicht signifikant; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*  $P < 0,05$  (Mann-Whitney U Test); SSC Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*); FCS Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*).

### 3.3.6 Der Klassenwechsel zu bestimmten Isotypen wird von ICOS differenziell reguliert

Nachdem nun kein Einfluss der ICOS/ICOS-L-Interaktion auf die Differenzierung der NP-spezifischen B-Zellen zu Plasmazellen festgestellt werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.5), sollte nun der Isotypwechsel analysiert werden. Die durch T-Effektorzellen freigesetzten Zytokine bestimmen dabei maßgeblich, in welche Richtung der Isotypwechsel verläuft. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die OVA-spezifischen T-Zellen überwiegend IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren (siehe Abschnitt 3.3.4), wurde insbesondere der Isotypwechsel nach IgG1 und IgE näher untersucht. IgA, als typisches Schleimhaut-assoziiertes Immunglobulin, war ebenfalls von Interesse. Durch intrazelluläre Färbung der verschiedenen Immunglobulinisotypen war es möglich, den Isotypwechsel auf Einzelzellebene zu betrachten.

Von den drei gemessenen Isotypen wurde IgG1 am stärksten gebildet, gefolgt von IgA und nur wenigen IgE<sup>+</sup> NP-spezifischen B-Zellen (Abbildung 24B). Überraschenderweise beeinflusst die fehlende ICOS-Signalgebung zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen (KO-Gruppe) weder den Isotypwechsel nach IgG1 noch IgA (Abbildung 24B, rechts und Mitte). Lediglich IgE<sup>+</sup> B-Zellen sind in ihrer Frequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe um mehr als 50 % reduziert (Abbildung 24B, links). Ein anderes Bild ergibt sich, wenn der Ligand auf den antigenspezifischen B-Zellen fehlt (B-KO-Gruppe). In diesem Fall verschiebt sich der Isotypwechsel zugunsten von IgG1 und es werden im Gegenzug weniger IgA<sup>+</sup> B-Zellen gebildet (Abbildung 24B, links und Mitte). IgE<sup>+</sup> B-Zellen dagegen treten in vergleichbarer Frequenz zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 24B, rechts). Aufgrund der unterschiedlichen Rolle, die ICOS/ICOS-L in Abhängigkeit von der Ligand tragenden Zelle für die klonale Expansion der B-Zellen spielt, ergibt sich auf Ebene der absoluten Zellzahlen an Isotyp-gewechselten B-Zellen, insbesondere für die KO-Gruppe, ein vollkommen anderes Bild. Bedingt durch die starke Beeinträchtigung der B-Zell-Expansion in der KO-Gruppe (siehe Abschnitt

3.3.2), finden sich absolut statistisch signifikant weniger IgA<sup>+</sup> und IgG1<sup>+</sup> Zellen, obwohl der Isotypwechsel *per se* auf Einzelzellebene nicht verändert ist (Abbildung 24C, links und Mitte). Ist zusätzlich der Isotypwechsel auf Einzelzellebene reduziert, ist die Reduktion der absoluten Zellzahl an Isotyp-gewechselten B-Zellen umso stärker und es sind kaum IgE<sup>+</sup> NP-spezifische B-Zellen im Lymphknoten der KO-Gruppe detektierbar (Abbildung 24C, rechts). Da die klonale Expansion der B-Zellen in der B-KO-Gruppe nicht beeinträchtigt ist, lassen sich im Lymphknoten dieser Tiere absolut weniger IgA<sup>+</sup> B-Zellen und dafür mehr IgG1<sup>+</sup> B-Zellen finden (Abbildung 24C, links und Mitte). Die Zahl an IgE<sup>+</sup> B-Zellen ist zur Kontrollgruppe unverändert. Die Kostimulation über ICOS wirkt sich, in Abhängigkeit von der ICOS-L tragenden Zelle und vom Isotyp, unterschiedlich auf den Isotypwechsel aus, nicht aber auf die Fähigkeit der B-Zellen zu Plasmazellen zu differenzieren.



**Abbildung 24. Einfluss der ICOS/ICOS-L-Interaktion auf den Immunglobulin-Klassenwechsel.**

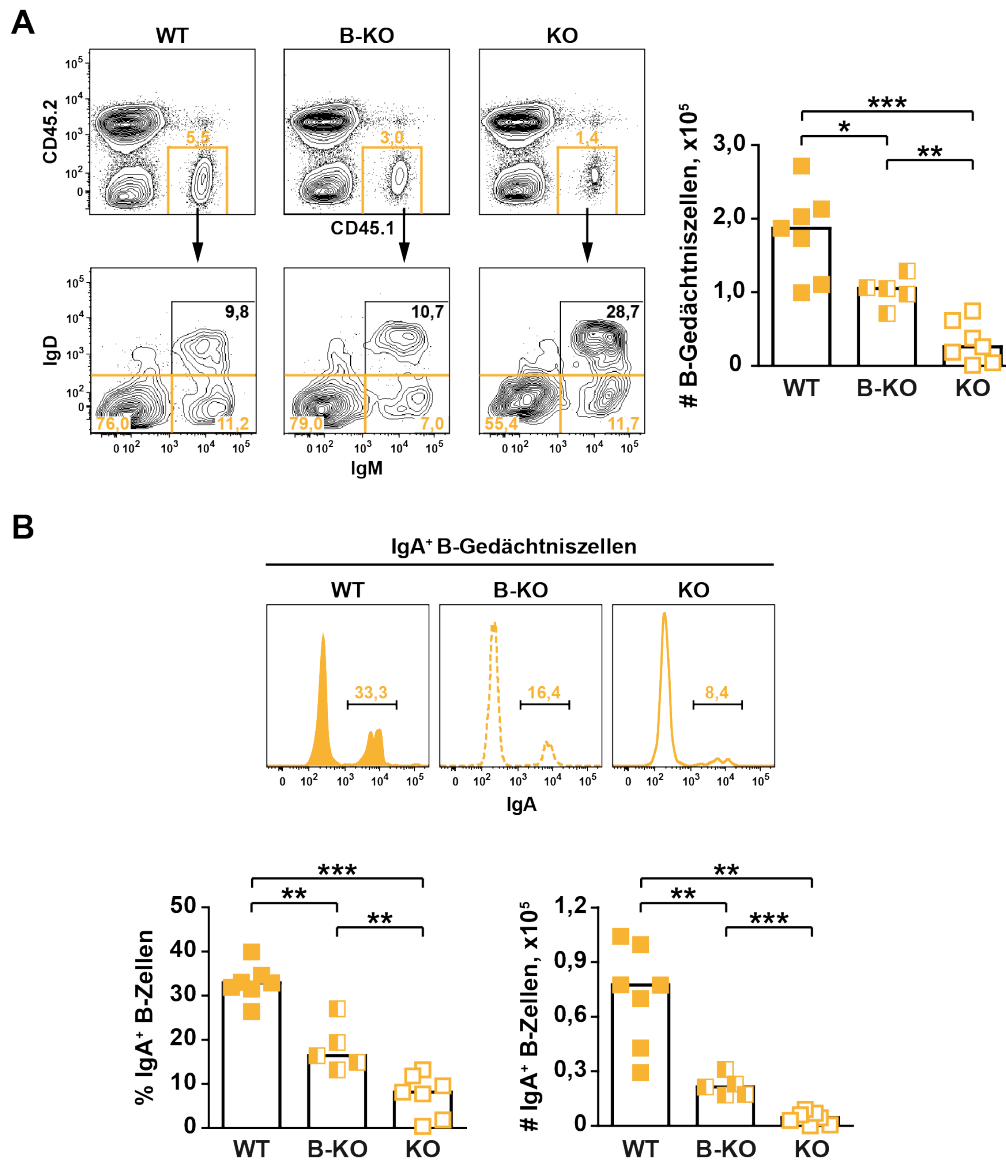
$2 \times 10^6$  T<sub>H</sub>2-polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT oder ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS-L KO Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intranasal mit 5  $\mu$ g NP-OVA + 5  $\mu$ g LPS an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer sowie an den Tagen 10 und 13. An Tag 17 wurden Zellen aus dem Lymphknoten isoliert und durchflusszytometrisch auf verschiedene Immunglobulinisotypen untersucht. Gezeigt sind

repräsentative durchflusszytometrische Färbungen (intrazellulär) auf IgA<sup>+</sup>, IgG1<sup>+</sup> und IgE<sup>+</sup> Plasmazellen (oben), die Frequenzen an Isotyp-gewechselten Plasmazellen bezogen auf alle NP-spezifischen Plasmazellen (definiert als CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G/C<sup>-</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup> CD19<sup>int</sup> CD138<sup>+</sup>) sowie die absoluten Zellzahlen an IgX<sup>+</sup> antigenspezifischen Plasmazellen. Die Höhe der Balken in den Diagrammen repräsentiert den Median. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei. ns nicht signifikant; \*\* P < 0,01 (Mann-Whitney U Test).

### **3.3.7 B-Gedächtniszellen sind auf die ICOS/ICOS-L-Interaktion mit T-Zellen angewiesen**

Nachdem eine B-Zelle von einer T-Zelle aktiviert worden ist, kann sie sich entweder zur antikörperproduzierenden Plasmazelle entwickeln oder zur B-Gedächtniszelle werden (siehe Abschnitt 1.4). Da ein Einfluss von ICOS auf die Differenzierung zu Plasmazellen ausgeschlossen werden konnte, stellte sich die Frage, inwiefern B-Gedächtniszellen auf die Interaktion mit T-Zellen über ICOS-L angewiesen sind. Erneut wurde das unter 3.3.1 beschriebene experimentelle System verwendet, mit dem Unterschied, dass B-Zellen aus dem Lungengewebe erst an Tag 41 analysiert wurden. Aktivierte (IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>) antigenspezifische B-Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt und damit 28 Tage nach der letzten Antigengabe noch immer im Lungengewebe fanden, wurden hierbei als B-Gedächtniszellen definiert (Abbildung 25A). Die Unfähigkeit der NP-spezifischen B-Zellen, mit OVA-spezifischen T-Zellen über ICOS-L zu interagieren (B-KO), führt zu einer 50%igen Reduktion an NP-spezifischen B-Zellen im Lungengewebe (Abbildung 25A). Eine noch viele stärkere Reduktion zeigt sich für die KO-Gruppe. Der Unterschied in der Expansion, der bereits in der frühen Phase der Immunantwort sichtbar war, ist am späten Zeitpunkt umso stärker und es finden sich über 80 % weniger NP-spezifische B-Zellen im Lungengewebe der ICOS-L KO Mäuse (Abbildung 25A).

IgA ist der vorherrschende Immunglobulin-Isotyp in mukosalen Geweben und IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen halten sich vor allem im Mukosa-assoziiertem Gewebe auf. Daher sollte insbesondere der Isotypwechsel nach IgA untersucht werden. In beiden KO-Gruppen ist die Zellzahl an B-Gedächtniszellen im Vergleich zum WT stark reduziert (Abbildung 25A). Darüber hinaus ist die Frequenz an IgA<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der B-Gedächtniszell-Population signifikant vermindert (Abbildung 25B). Ein Fehlen des Liganden auf B-Zellen (B-KO) führt auf der Frequenzebene zu einer 50%igen Reduktion an IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen, die in der KO-Gruppe nochmals um 50 % reduziert sind. Da die Gesamtzellzahl an B-Gedächtniszellen in beiden KO-Gruppen bereits stark beeinträchtigt ist, lassen sich absolut kaum noch IgA<sup>+</sup> B-Zellen detektieren. So ist die Anzahl an IgA<sup>+</sup> B-Zellen in der B-KO-Gruppe um den Faktor vier, in der KO-Gruppe um den Faktor 16 im Vergleich zur WT-Gruppe verringert. B-Gedächtniszellen sind im Gegensatz zu naiven B-Zellen verstärkt auf die Interaktion mit T-Zellen über ICOS-L angewiesen.



**Abbildung 25. Rolle von ICOS-L für die Aufrechterhaltung von B-Gedächtniszellen.**

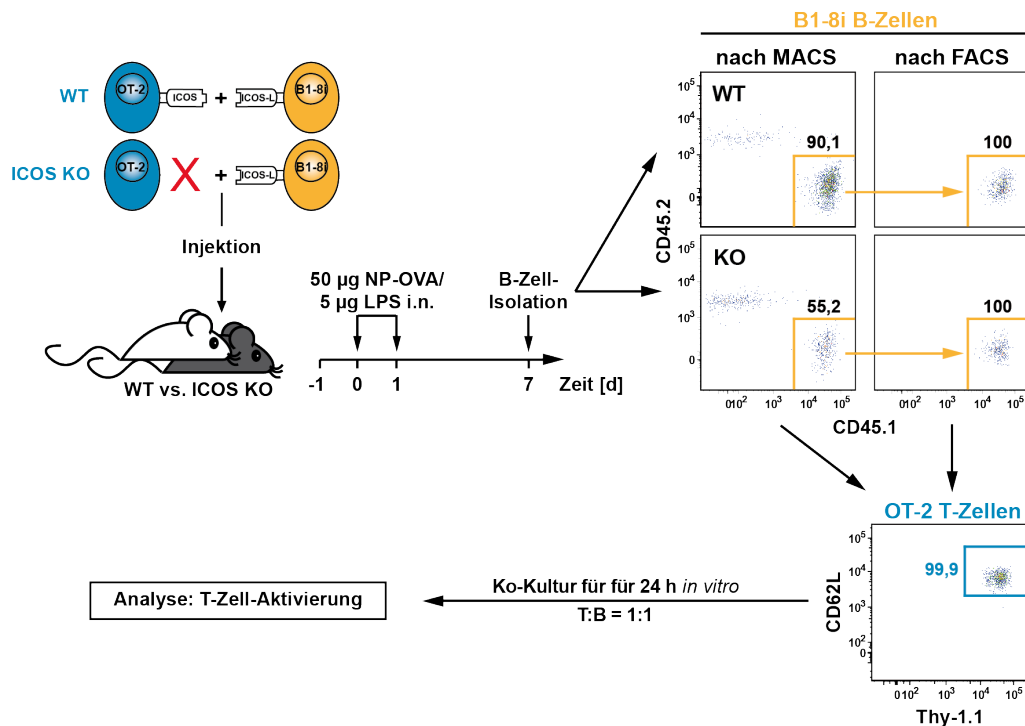
$2 \times 10^6$  T<sub>H</sub>2-polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT bzw. ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT versus ICOS-L KO Mäuse transferiert. Intranasale (i. n.) Antigengabe von  $5 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an d0, d1, d10 und d13. Analyse der Lungen an d41. **(A)** durchflusszytometrische Analyse auf antigenspezifische B-Gedächtniszellen (definiert als DAPI<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/CD11c<sup>-</sup>/Ly6G<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> IgD/IgM<sup>-</sup> CD45.2<sup>+</sup> CD45.1<sup>+</sup>). Gezeigt sind repräsentative Färbungen von Isotyp-gewechselt, antigenspezifischen B-Zellen von einem Tier pro Gruppe sowie die absoluten B-Zellzahlen aller Tiere der drei Gruppen (mit  $n = 7$  [WT, KO] und  $n = 5$  [B-KO]). **(B)** durchflusszytometrische Analyse auf IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen in der Lunge, dargestellt als Frequenz bezogen auf alle B-Gedächtniszellen und absolute Zellzahlen an IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen. Die Histogramme zeigen eine repräsentative Färbung auf IgA von einem Tier pro Gruppe. Die Höhe der Balken in den Diagrammen entspricht dem Median. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (Mann-Whitney U Test).

### **3.4 Die Rolle von ICOS für die antigenpräsentierende Funktion von B-Zellen im entzündeten Gewebe**

#### **3.4.1 Die antigenpräsentierende Funktion von B-Zellen wird durch ICOS positiv beeinflusst**

B-Zellen können neben Dendritischen Zellen ebenfalls als antigenpräsentierende Zellen (APZ) wirksam werden. So ist die Fähigkeit, ein spezifisches Antigen zu erkennen, aufnehmen zu können, zu prozessieren und über MHC-II-Moleküle zu präsentieren, Grundvoraussetzung dafür, dass B-Zellen im Lymphknoten zu Beginn einer Immunantwort durch T-Zellen aktiviert werden. Die Affinität ihres B-Zell-Rezeptors (BZR) für ein bestimmtes Antigen ist zu Beginn einer Immunantwort noch gering, wird sich aber im Verlauf der Immunantwort zunehmend steigern. Mit steigender Affinität für das Antigen, steigt auch ihre Fähigkeit als antigenpräsentierende Zellen (APZ) wirksam zu werden. In Situationen, in denen antigenlimitierende Bedingungen herrschen, haben B-Zellen als APZ sogar einen Vorteil gegenüber Dendritischen Zellen, da sie in der Lage sind, geringste Mengen an Antigen antigenspezifisch und rezeptorvermittelt zu binden. Allergene, die über die Atemwege in den Organismus gelangen, liegen im Allgemeinen in sehr geringe Dosen vor. So ist es vorstellbar, dass B-Zellen in solchen Situationen als APZ von zunehmender Bedeutung sind. Um zu überprüfen, ob B-Zellen in unserem Modellsystem in der Lage sind, Antigen auch außerhalb lymphoider Organe zu präsentieren und ob und inwiefern die Interaktion über ICOS auf die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen Einfluss nimmt, fand folgendes experimentelles System Verwendung:

$2 \times 10^6$  WT oder ICOS KO OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS KO Tiere transferiert. An den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer bekamen die Tiere  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS intranasal verabreicht. Anschließend wurden die antigenspezifischen B-Zellen an Tag sieben aus den Lungen reisoliert und zu hoher Reinheit sortiert. In An- oder Abwesenheit von NP-OVA wurden die B-Zellen mit ebenfalls rein sortierten, naiven OVA-spezifischen T-Zellen für 24 Stunden *in vitro* kultiviert. Nach Ablauf der Zeit wurden die T-Zellen auf die Expression früher T-Zell-Aktivierungsmarker (CD25, CD69 und OX40) untersucht und zeitgleich die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen (Abbildung 26).

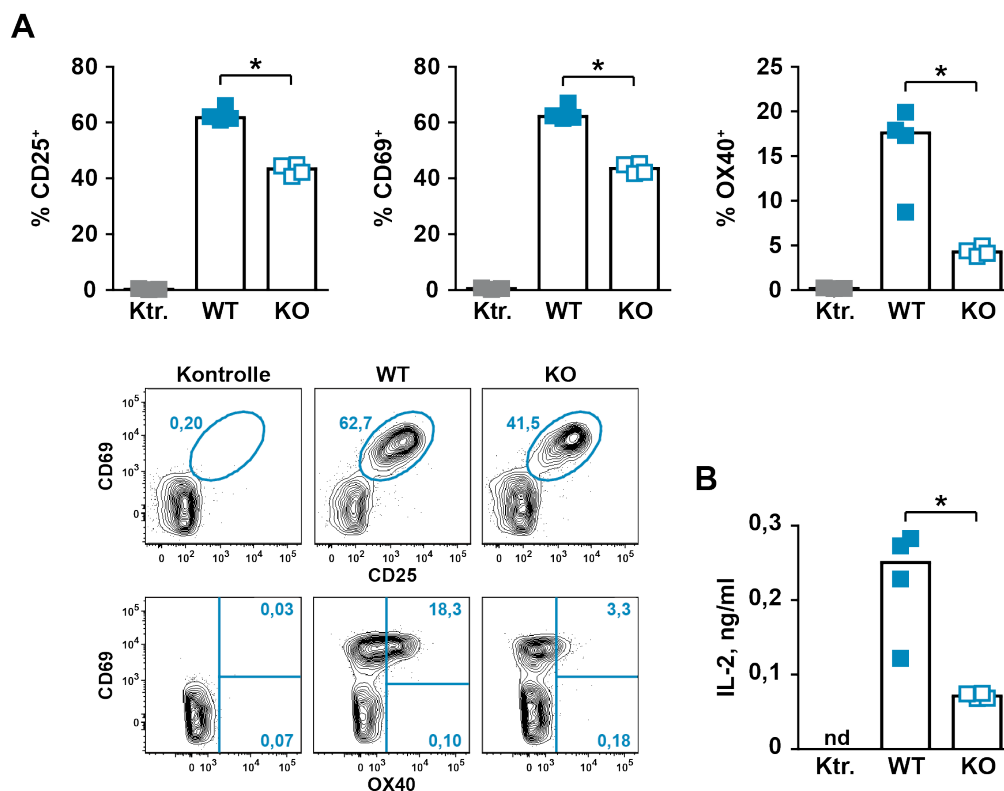


**Abbildung 26. Experimentelles System zum Nachweis der antigenpräsentierenden Funktion von B-Zellen.**

$2 \times 10^6$  naive WT oder ICOS KO OVA-spezifische T-Zellen wurden mit  $2 \times 10^6$  WT NP-spezifischen B-Zellen in WT oder ICOS KO Mäuse transferiert (Vergleich mit 3.2.1). Die Immunisierung erfolgte mit  $50 \mu\text{g}$  NP-OVA +  $5 \mu\text{g}$  LPS an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Transfer. An d7 erfolgte die Reisolation der B-Zellen aus der Lunge und die Sortierung von  $\text{CD}19^+ \text{CD}45.2^+ \text{CD}45.1^+$  B-Zellen über MACS und FACS. Ebenfalls über FACS rein sortierte  $\text{CD}19^+ \text{CD}4^+ \text{Thy-1.1}^+ \text{CD}62\text{L}^+$  OVA-spezifische T-Zellen (aus WT OT-II) wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit NP-spezifischen B-Zellen (aus WT oder ICOS KO Mäusen) in An- oder Abwesenheit von  $10 \mu\text{g/ml}$  NP-OVA ko-kultiviert. Analyse der T-Zell-Aktivierung nach 24 h. T T-Zellen; B B-Zellen; MACS *magnetic activated cell sorting*; FACS *fluorescence-activated cell sorting*; NP-OVA Nitrophenol-Ovalbumin-Konjugat.

Prinzipiell sind die reisolierten NP-spezifischen B-Zellen in der Lage, das Proteinantigen rezeptorvermittelt aufzunehmen, zu prozessieren, MHC-II-gebunden zu präsentieren und infolgedessen T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren. Denn nur dann, wenn dem Ansatz Proteinantigen (NP-OVA) zugegeben wurde, wurden die OVA-spezifischen T-Zellen aktiviert. Die Ko-Kultur von T- und B-Zellen in Abwesenheit des NP-OVA-Proteinantigens ließ keine Aktivierung der T-Zellen erkennen (Abbildung 27A). NP-spezifische B-Zellen sind in ihrer Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, deutlich beeinträchtigt, wenn die initiale Aktivierung in einer ICOS-freien Umgebung (KO) erfolgt. Die Frequenzen an  $\text{CD}25^+$ ,  $\text{CD}69^+$  und  $\text{OX}40^+$  T-Zellen sind statistisch signifikant verringert und es wurden deutlich weniger Aktivierungsmoleküle pro T-Zelle exprimiert (Abbildung 27A und Daten nicht gezeigt). Zusätzlich dazu ist auch die Menge an IL-2 im Zellkulturüberstand signifikant reduziert (Abbildung 27B). Diese Daten belegen, dass B-Zellen als APZ im entzündeten Gewebe fungieren können, und dass ICOS die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen fördert.

Ein vergleichbares Experiment wurde auch mit ICOS-L KO B-Zellen durchgeführt. In diesem Fall fehlte der Ligand nur auf den B-Zellen und die Interaktion über ICOS von T-Zellen und Dendritischen Zellen war damit noch möglich. Die Reisolation der ICOS-L KO B-Zellen aus WT Mäusen und der Vergleich ihrer antigenpräsentierenden Funktion mit der von WT B-Zellen führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 27. B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APZ).**

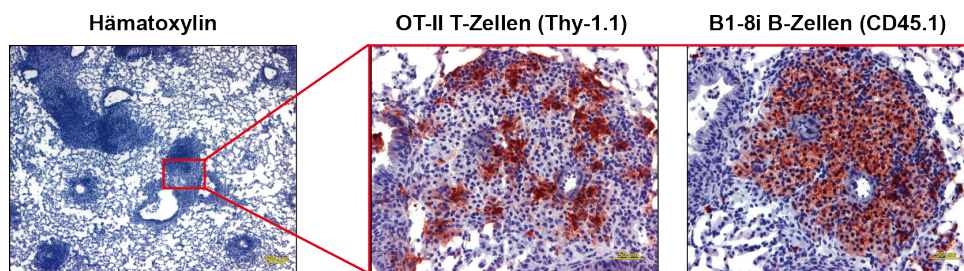
(A) Durchflusszytometrische Analyse verschiedener früher T-Zell-Aktivierungsmarker auf OVA-spezifischen T-Zellen. Gezeigt sind repräsentative Färbungen für CD25, CD69 und OX40 unter An- (WT, KO) und Abwesenheit (Ktr.) von NP-OVA in Gegenwart von B-Zellen aus WT (WT) bzw. ICOS KO (KO) Mäusen. (B) ELISA auf IL-2 im Zellkulturüberstand. Gezeigt ist die Konzentration an IL-2 in ng/ml. Symbole in den Diagrammen repräsentieren Replikate (n = 3 oder 4). Die Höhe der Balken entspricht dem Median. \* P < 0,05 (Mann-Whitney U Test). nd nicht detektierbar.

### 3.4.2 Die Interaktion von ICOS/ICOS-L zwischen T- und B-Zellen findet im Verlauf der Atemwegsentzündung in Bronchus-assoziierten lymphoiden Strukturen statt

Die Qualität der ICOS-Kostimulation unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Ligand tragenden Partnerzelle. So wird deutlich, dass B-Zellen im Vergleich zu Dendritischen Zellen zu Beginn einer Immunantwort einen geringeren Beitrag über ICOS-L leisten. Mit der Aktivierung und



Differenzierung zu B-Gedächtniszellen gewinnen B-Zellen als ICOS-L tragende Zellen zunehmend an Bedeutung und beeinflussen nicht nur die T-Zell-Effektorfunktionen (siehe Abschnitt 3.3.4), sondern auch sich selbst. Im Verlauf der Entzündungsreaktion in der Lunge kommt es zur Akkumulation von Zellen, die perivascular lokalisiert sind (siehe Abschnitt 3.1.7). Innerhalb dieser Aggregate finden sich auch antigenspezifische T- und B-Zellen in engem Kontakt zueinander wieder (Abbildung 28).



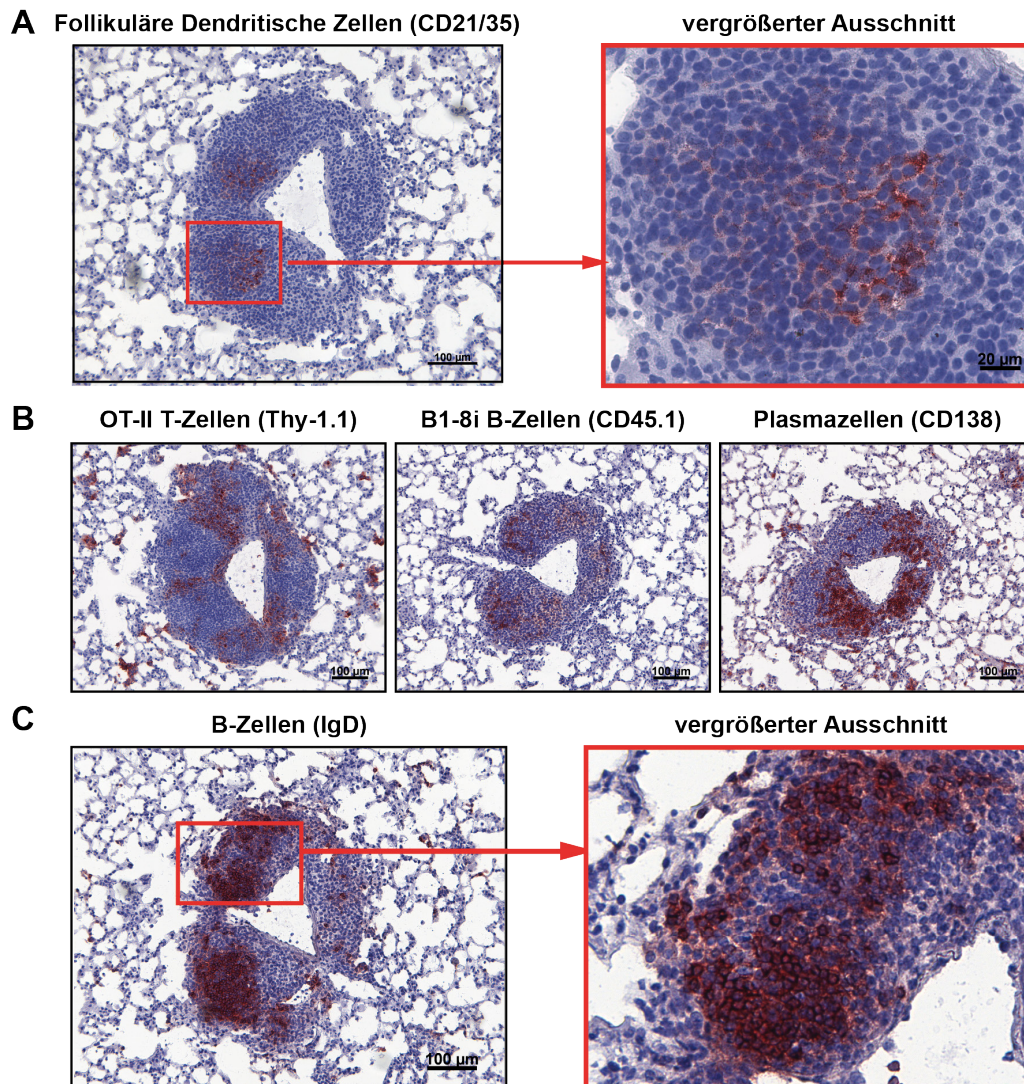
**Abbildung 28. Antigenspezifische T- und B-Zellen im zellulären Infiltrat.**

Immunohistochemische Färbung von 8  $\mu\text{m}$  Gefrier-Serienschnitten der Lunge. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau angefärbt. Die Zielzellen sind an ihrer rot-braunen Färbung erkennbar. Die Bildung zellulärer, perivascularer Infiltrate ist zu sehen. Innerhalb der Infiltrate kommt es zur Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen (gefärbt über Thy-1.1) und antigenspezifischer B-Zellen (gefärbt über CD45.1), die in engem Kontakt zueinander liegen. Vergrößerung: 5X (links) und 20X (Ausschnitte).

B-Zellen können als antigenpräsentierende Zellen im entzündeten Gewebe wirksam werden (siehe Abschnitt 3.4.1) und so ist denkbar, dass sie die entsprechenden Kooperationspartner-T-Zellen bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen/Allergen lokal im Gewebe reaktivieren. Die Bildung von tertiären lymphoiden Strukturen ist ein Indikator dafür, dass Immunantworten lokal induziert werden können und gilt als Voraussetzung dafür, dass Gedächtniszellen im Gewebe aufrechterhalten werden. Um den Nachweis zu erbringen, dass die gemachten Beobachtungen in Bezug auf die Rolle von ICOS in der T-B-Interaktion auf eine beeinträchtigte Kooperation dieser Zellen in tertiären lymphoiden Geweben zurückgeführt werden können, sollte die Existenz ektopischer Strukturen histologisch überprüft werden.

Die Lungen von WT Mäusen, die zuvor  $2 \times 10^6$   $T_H2$ -polarisierte T-Zellen und dieselbe Zahl an WT B-Zellen injiziert und nachfolgend viermalig NP-OVA i. n. appliziert bekamen, wurden an Tag 20 aus den Tieren isoliert und Gefrierschnitte von 8  $\mu\text{m}$  Schnittdicke als Serienschnitte angefertigt. Die Meinungen darüber, wie Bronchus-assoziiertes lymphoides Gewebe (BALT) histologisch zu definieren ist, gehen auseinander. Nach der Definition von Randall (Randall, 2010) gilt die Existenz Follikulärer Dendritischer Zellen (FDZ) als zwingende Voraussetzung. Follikuläre Dendritische Zellen dienen als Reservoir für Antigen. Sie sind darauf spezialisiert, Antigene in Form von Immunkomplexen einzufangen, die sie u.a. über Komplementrezeptoren binden. Solch ein

Komplementrezeptor ist CD21/35 und so können FDZ histologisch über diesen Marker identifiziert werden. Wie in Abbildung 29A zu sehen ist, ergibt die Färbung auf CD21/35 das für FDZ charakteristische Färbemuster und es lassen sich lokal angefärbte Bereiche innerhalb des zellulären Infiltrats erkennen. Die weiterführende Analyse auf antigenspezifische T- und B-Zellen zeigt, dass NP-spezifische B-Zellen im Bereich der FDZ zu finden sind und von den OVA-spezifischen T-Zellen flankiert werden. CD138<sup>+</sup> Plasmazellen sind außerhalb des B-Zell-Follikels lokalisiert (Abbildung 29B). Des Weiteren wurde berichtet, dass IgD<sup>hoch</sup> IgM<sup>-</sup> exprimierende, mature aber ruhende B-Zellen in BALT Strukturen vorkommen (Kocks, 2007). IgD<sup>+</sup> Zellen lassen sich ebenfalls im B-Zell-Follikel finden. Die IgD-freien Stellen inmitten des IgD-angefärbten Bereiches lassen auf die Existenz von Keimzentren schließen, in denen die B-Zellen IgD zugunsten anderer Isotypen herunterreguliert haben (Abbildung 29C). Basierend auf den histologischen Befunden, ist die Existenz von Bronchus-assoziierten lymphoiden Strukturen in dem neu etablierten Modellsystem somit sehr wahrscheinlich.



**Abbildung 29. Histologischer Nachweis tertiärer lymphoider Strukturen im Lungengewebe.**

Unter Verwendung eines Kryostats wurden 8  $\mu\text{m}$  Gefrierschnitte als Serienschnitte angefertigt und unter Nutzung der indirekten Peroxidasetechnik auf das Vorhandensein verschiedener Proteine analysiert. Die Detektion erfolgte über die Substratumsetzung von AEC, die zu einem rot-braunen Farbniederschlag an der Stelle des Zielproteins führte. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gegengefärbt. **(A)** Detektion Follikulärer Dendritischer Zellen (FDZ) über CD21/CD35. **(B)** Analyse antigenspezifischer T- und B-Zellen, wobei T-Zellen über Thy-1.1 und B-Zellen über CD45.1 angefärbt wurden. Zur Detektion von Plasmazellen diente CD138. **(C)** Analyse IgD<sup>+</sup> Gesamt-B-Zellen. Der Ausschnitt zeigt ein mögliches Keimzentrum, in dem IgD auf B-Zellen herunterreguliert ist. Vergrößerung: 10X, bei den vergrößerten Ausschnitten 20X.

### 3.4.3 Keimzentrums-ähnliche B-Zellen aber nicht Follikuläre

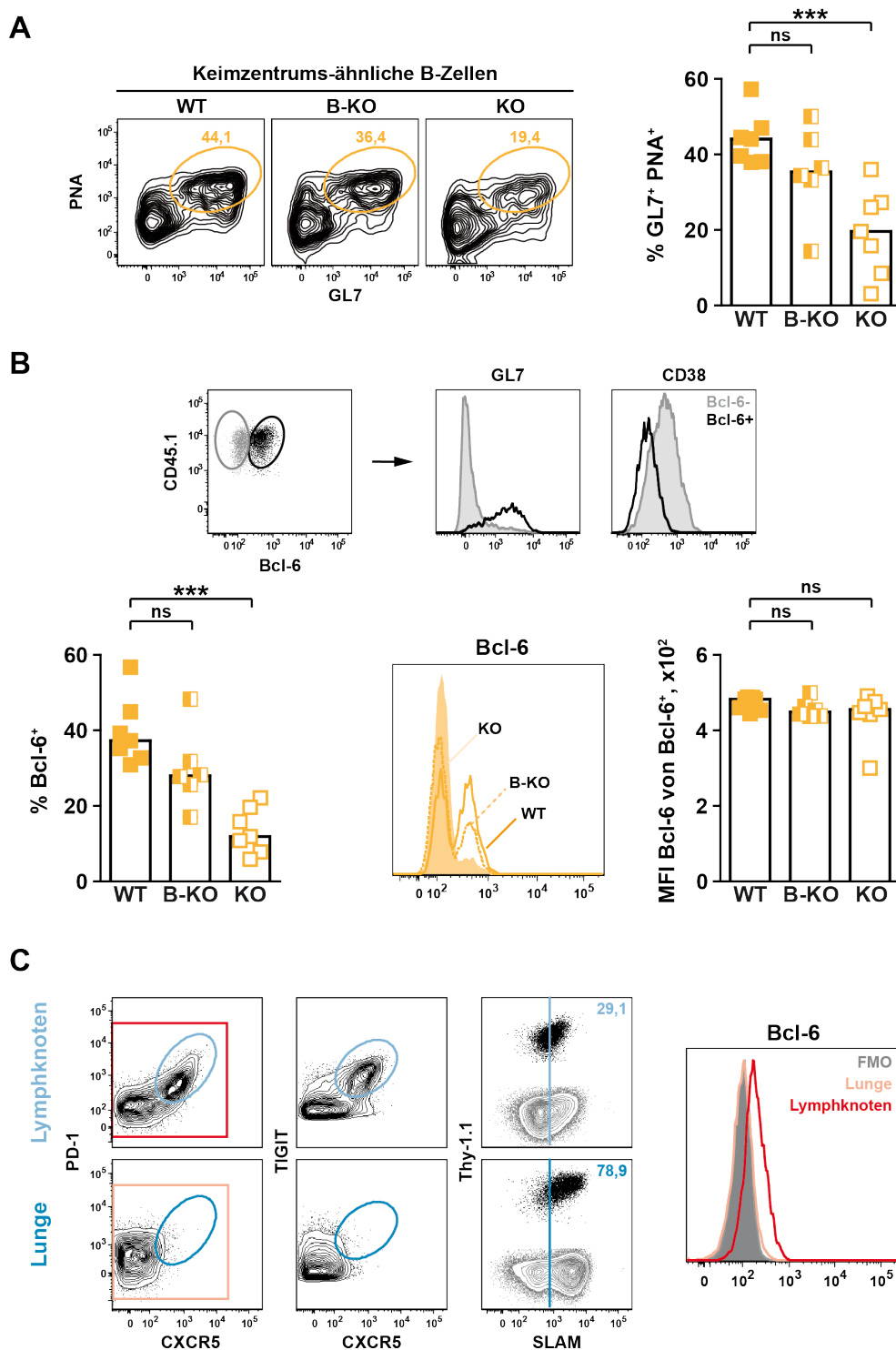
#### T-Helferzell-ähnliche Zellen lassen sich im Lungengewebe finden

Wenn es ektopische Keimzentren gibt, sollten auch Keimzentrums-B-Zellen (KZB) und Follikuläre T-Helferzellen ( $T_{\text{FH}}$ ) im Lungengewebe zu finden sein. Die durchflusszytometrische Analyse diente dazu, die antigenspezifischen T- und B-Zellen im Lungengewebe auf typische  $T_{\text{FH}}$ - und KZB-Marker

zu analysieren. Zusätzlich sollte auch hier die Rolle der ICOS/ICOS-L-Kostimulation untersucht werden.

Vergleichbar zum Lymphknoten lässt die Färbung mit GL7 und PNA doppelt positive NP-spezifische B-Zellen erkennen (Abbildung 30A). Im Gegensatz zum Lymphknoten weisen diese Zellen jedoch geringere Level an PNA auf (Vergleich mit Abbildung 19A). Die Abwesenheit des Liganden wirkt sich aber auch in der Lunge in Abhängigkeit von der Ligand tragenden Zelle unterschiedlich auf die Frequenz an Keimzentrums-ähnlichen B-Zellen aus. So zeigt sich in den ICOS-L KO Tieren (KO-Gruppe) eine stark verminderte Frequenz an  $GL7^+ PNA^+$  NP-spezifischen B-Zellen, die sich zwar in der B-KO-Gruppe ebenfalls andeutet, jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant reduziert ist (Abbildung 30A). Die anschließende Analyse der Bcl-6-Expression durch antigenspezifische B-Zellen zeigt deutlich, dass auch ein Teil der Lungen-B-Zellen Bcl-6 exprimiert (Abbildung 30B). Die Bcl-6-Expression geht dabei mit der Hochregulation von GL7 und einer Reduktion an Oberflächen-CD38 einher (Abbildung 30A, oben). Somit weisen diese B-Zellen alle Eigenschaften von Keimzentrums-B-Zellen auf (Vergleich mit Abbildung 19B). Einhergehend mit der verringerten Frequenz an  $GL7^+ PNA^+$  B-Zellen sind auch  $Bcl-6^+$  B-Zellen in ihrer Frequenz reduziert, wenn ICOS nicht mit ICOS-L auf Dendritischen Zellen interagieren kann (Abbildung 30B; KO). Eine Tendenz ist auch in der B-KO-Gruppe erkennbar, führt jedoch zu keinem signifikanten Unterschied. Diejenigen B-Zellen, die Bcl-6 exprimieren, unterscheiden sich dabei nicht in der Menge an Bcl-6-Protein, das durchschnittlich pro Zelle gemacht wird (Abbildung 30B, rechts) und so ist anzunehmen, dass sämtliche Bcl-6-vermittelte Prozesse in diesen Zellen ohne Einschränkungen ablaufen können.

Die Analyse der OVA-spezifischen T-Zellen zeigte, dass sich keine  $T_{FH}$ -Zell-Korrelate in der Lunge finden lassen. Die antigenspezifischen T-Zellen in der Lunge weisen weder CXCR5 noch TIGIT auf der Zelloberfläche auf und auch Bcl-6 wird von keiner T-Zelle in der Lunge exprimiert (Abbildung 30C). Interessanterweise zeigt sich jedoch auf diesen T-Zellen eine stark erhöhte Expression des Oberflächenproteins SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*), die so auf T-Zellen im Lymphknoten nicht zu beobachten ist (Abbildung 30C). Dies zeigt erneut, dass sich T-Zellen im entzündeten Gewebe in Bezug auf ihren Phänotyp als auch in Bezug auf die T-Effektorfunktionen deutlich von denen in lymphoiden Strukturen unterscheiden.



**Abbildung 30. Phänotypisierung von antigenspezifischen T- und B-Zellen im Lungengewebe hinsichtlich eines Keimzentrums- bzw. T-Helferzell-ähnlichen Phänotyps.**

$2 \times 10^6$  T<sub>H</sub>2-polarisierte, OVA-spezifische T-Zellen wurden zusammen mit  $2 \times 10^6$  WT bzw. ICOS-L KO NP-spezifischen B-Zellen in WT versus ICOS-L KO Mäuse transfertiert. Intranasale Antigengabe von 5  $\mu$ g NP-OVA + 5  $\mu$ g LPS an d0, d1, d10 und d13. Analyse der Lungen an d17. **(A)** Durchflusszytometrische Analyse auf GL7<sup>+</sup> PNA<sup>+</sup> NP-spezifische B-Zellen.

Gezeigt sind repräsentative Färbungen (links) sowie die Ergebnisse für  $GL7^+ PNA^+$  B-Zellen aller Tiere für die jeweilige Gruppe (rechts). **(B)** Intrazelluläre Färbung auf Bcl-6. Phänotypisierung der  $Bcl-6^+$  B-Zellen in Bezug auf die Expression von GL7 und CD38 (oben) sowie zusammenfassende Darstellung der  $Bcl-6^+$  NP-spezifischen B-Zellen und die MFI von Bcl-6 (bezogen auf  $Bcl-6^+$  B-Zellen) pro Gruppe. Das Histogramm zeigt eine repräsentative Färbung auf Bcl-6, wobei ein Tier pro Gruppe gezeigt ist. **(C)** durchflusszytometrische Analyse OVA-spezifischer T-Zellen auf CXCR5, TIGIT, PD-1, SLAM und Bcl-6. Die Frequenz an  $SLAM^+$  OVA-spezifischen T-Zellen ist dargestellt. Das Histogramm zeigt eine vergleichende repräsentative Färbung für Bcl-6 in T-Zellen aus Lymphknoten und Lunge. Als Kontrolle dienten Zellen, in denen Bcl-6 nicht intrazellulär gefärbt wurde (FMO *Fluorescence Minus One*). Die Frequenz von  $GL7^+ PNA^+$  und  $Bcl-6^+$  B-Zellen bezieht sich dabei auf die Gesamtheit an NP-spezifischen B-Zellen (definiert als  $DAPI^- CD3^- CD8^- CD11c^- Ly6GC^- CD19^+ CD45.2^- CD45.1^+$ ). Die Höhe der Balken in den Diagrammen entspricht dem Median. ns nicht signifikant; \*\*\*  $P < 0,001$  (Mann-Whitney U Test). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei (A+B) bzw. ein Experiment (C) mit  $n = 6-7$  (A+B) und  $n = 8-10$  (C).

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung eines neuartigen Atemwegsinflammationsmodells

Bedingt durch die Komplexität und Heterogenität der asthmatischen Erkrankung, sind die zugrunde liegenden Mechanismen gegenwärtig nur unzureichend erforscht. Die Modellierung von Asthma in Mäusen wird jedoch kritisch diskutiert (Kips, 2003; Epstein, 2004; Zosky und Sly, 2007; Allen, 2009). Dennoch bieten sich Mäuse aus verschiedenen Gründen als Modellsysteme an. Das klassische Asthmodell in der Maus, das am breitesten Anwendung findet, ist das Modell der aktiven Sensibilisierung (Abbildung 11A). Dabei werden BALB/c-Mäuse zunächst systemisch immunisiert, indem sie das Proteinantigen (häufig Ovalbumin) zusammen mit einem T<sub>H</sub>2-induzierenden Agens (z.B. Aluminiumhydroxid) i. p. verabreicht bekommen. Diese Behandlung dient dazu, die antigenspezifischen T-Zellen, die in sehr geringen Frequenzen vorliegen, zu expandieren. Nachfolgend wird das Antigen mehrmals lokal appliziert. Die lokale Applikation des Proteinantigens kann dabei vielfältig erfolgen, wird aber überwiegend durch das Einatmen von aerosolisiertem Ovalbumin erreicht. Gelegentlich erfolgt die Antigengabe auch intranasal oder intratracheal (i. t.). Die so behandelten Tiere weisen typische Kennzeichen von Asthma auf und so lassen sich zelluläre Infiltrate, eine Erhöhung an eosinophilen Granulozyten in der Bronchoalveolar-Lavage und im Lungengewebe und teilweise auch strukturelle Veränderungen im Lungengewebe beobachten (Abbildung 11C, Lloyd, 2001). Ein wesentlicher Nachteil der aktiven Sensibilisierung besteht darin, dass sich dieses Modell auf die Aktivierung endogener antigenspezifischer T-Zellen gründet, die *in vivo* nicht ohne Weiteres verfolgt werden können. Weiterhin entspricht der erste Kontakt mit dem Antigen nicht dem natürlichen Eintrittsweg von Allergenen über die Atemwege. Der Gebrauch von Aluminiumhydroxid als Adjuvanz ist zudem unphysiologisch und damit sehr artifiziell.

Mit der Zielvorgabe, ein Modellsystem zu entwickeln, das es ermöglicht, antigenspezifische T- und B-Zellen in ihrer Interaktion im entzündeten Gewebe zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges Atemwegsentzündungsmodell etabliert, welches viele Schlüsselkomponenten der asthmatischen Erkrankung aufweist (Abbildung 11). Die Basis bildete dabei ein adoptives Transfersystem, das bereits in der Arbeitsgruppe etabliert war (Dahler, 2009) und sich auf den parallelen Transfer OVA-spezifischer T-Zellen und NP-spezifischer B-Zellen gründet. Dadurch wurde es möglich, nicht nur antigenspezifische T-Zellen *in vivo* zu verfolgen, sondern auch die Rolle von B-Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren. Im Gegensatz zum klassischen Asthmodell wurde das Proteinantigen (NP-OVA) ausschließlich lokal appliziert, wobei bereits die alleinige intranasale Antigengabe ausreichend war, um die Migration unterschiedlicher Zellen ins Gewebe zu bewirken

(Abbildung 11C). Die durch Holt und Kollegen postulierte Toleranzinduktion (Holt, 1981), die infolge der alleinigen i. n. Antigengabe eintreten soll, konnte in unserem Modellsystem nicht beobachtet werden, möglicherweise weil das verabreichte Proteinantigen nicht Endotoxin-frei war.

Lipopolysaccharid, das in der bakteriellen Zellwand gram-negativer Bakterien vorkommt, ist ubiquitär verbreitet und findet sich somit auch in der Luft. Eine Rolle von LPS in der Induktion asthmatischer Reaktionen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So werden LPS einerseits verstärkende (Wan, 2000; Eisenbarth, 2002; Stephens, 2002; Delayre-Orthez, 2004), andererseits mildernde Fähigkeiten (Watanabe, 2003; Rodriguez, 2003; Velasco, 2005) zugesprochen. Im neu etablierten Atemwegsinfektionsmodell wirkt sich LPS positiv auf die Expansion und auch Aktivierung antigenspezifischer T- und aber auch B-Zellen aus (Abbildung 7 und Abbildung 8). So konnte beobachtet werden, dass in Abwesenheit von LPS nur sehr geringe Frequenzen an antigenspezifischen B-Zellen im Lungengewebe zu finden sind (Daten nicht gezeigt). Mitogene Effekte von LPS auf B-Zellen (Andersson, 1973) konnten wir ausschließen, da mit LPS allein in Abwesenheit des Proteinantigens kein positiver Effekt zu beobachten war (Abbildung 8C). Vielmehr kann vermutet werden, dass die gesteigerte Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen in Anwesenheit von LPS (Abbildung 7) in einer verstärkten T-Zell-Helfertätigkeit mündet, wodurch die B-Zellen folglich besser aktiviert werden. Die gesteigerte Expansion und Aktivierung der T-Zellen in Anwesenheit von LPS lässt sich wiederum auf die LPS-induzierte Reifung Dendritischer Zellen zurückführen (Sallusto, 1995) und spiegelt Beobachtungen wieder, die erst kürzlich veröffentlicht wurden (Lischke, 2012). In einem Modellsystem, das die Mechanismen von Toleranz und Immunität näher definiert, konnte gezeigt werden, dass antigenspezifische T-Zellen in Anwesenheit eines pathogenen Antigens (= OVA + LPS) sehr viel stärker proliferieren als mit hoch reinem, Endotoxin-freiem Ovalbuminprotein allein. Zusätzlich wurde auch ICOS nur in Anwesenheit von LPS auf der Oberfläche der T-Zellen hochreguliert. Demnach ist LPS in dem vorliegenden Modellsystem essenziell, um eine starke Entzündungsreaktion in Gang zu setzen und insbesondere die Kooperation antigenspezifischer T- und B-Zellen zu fördern.

Wright und Kollegen konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten CD14 exprimieren, infolgedessen in der Lage sind, LPS im Komplex mit dem LPS-bindenden Protein zu erkennen und darauf zu reagieren (Wright, 1991). Die intranasale Antigengabe zusammen mit LPS führte in diesem Modellsystem zu einem starken Einstrom von neutrophilen Granulozyten, der dosisabhängig erfolgte (Abbildung 9). Ursächlich dafür ist die Freisetzung des Chemokins IL-8, das beispielsweise durch Makrophagen aber auch durch eine Vielzahl anderer Zelltypen nach LPS-Kontakt gebildet wird und neutrophile Granulozyten ins Entzündungsgebiet rekrutiert (Harada, 1994). Obwohl die Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die asthmatische Erkrankung zunehmend Bestandteil aktueller



Forschung ist (Mann und Chung, 2006; Shaw, 2007; Baines, 2010), gelten Eosinophile weiterhin als das Kennzeichen des allergischen Asthmas. Aus diesem Grund war die Präsenz eosinophiler Granulozyten auch für dieses Modellsystem wünschenswert. Die *in vitro* T<sub>H</sub>2-Polarisierung der adoptiv transferierten OVA-spezifischen T-Zellen induzierte eine überwiegend durch eosinophile Granulozyten dominierte Entzündungsreaktion (Abbildung 10), die durch die gesteigerte Fähigkeit der T-Zellen zur IL-5-Ausschüttung begründet werden kann (Yamagushi, 1988). Die erhöhte Expression des Oberflächenproteins Siglec-F verbunden mit der gesteigerten CD11c-Expression durch Eosinophile lassen außerdem laut Rose und Mitarbeiter auf einen aktivierten Phänotyp dieser Zellen schließen (Rose, 2010), der nach Transfer OVA-spezifischer T<sub>H</sub>0-T-Zellen nicht zu beobachten war (Abbildung 10). Therapieansätze, die auf der Blockade von IL-5 unter Verwendung von anti-IL-5-Antikörpern beruhen, befanden sich bereits in klinischen Studien, wenn auch mit mässigem Erfolg (Leckie, 2000; Kips, 2003; Flood-Page, 2007).

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Atemwegsinflamationsmodell wird es möglich, Prozesse von neutrophilem aber auch eosinophilem Asthma zu modellieren. Dies gelingt durch den Transfer von OVA-spezifischen T<sub>H</sub>2-polarisierten- oder T<sub>H</sub>0-T-Zellen. Die alleinige intranasale Antigenapplikation unter Nutzung von LPS, als natürlich vorkommendes Adjuvanz, ist physiologischer und unterscheidet dieses Modell von bereits etablierten Modellsystemen. Durch den adoptiven Transfer von antigenspezifischen T- und B-Zellen, der mit einer Erhöhung der Startfrequenz der antigenspezifischen Zellen verbunden ist, wird eine Verkürzung des Behandlungsprotokolls erreicht. Zusätzlich erlaubt dieses Modellsystem, die Rolle von T-Zellen und zusätzlich auch von B-Zellen auf Einzelzellebene zu untersuchen. Die parallele Analyse des Lungengewebes und des Lungen-drainierenden Lymphknotens macht es möglich, immunologische Prozesse im lymphoiden Organ von denen im entzündeten, nicht-lymphoiden Gewebe abzugrenzen. Dadurch werden detaillierte Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen ermöglicht. Zudem bietet die Nutzung von C57BL/6 Mäusen den Vorteil, auf eine größere Palette genetisch modifizierter Tiere zurückgreifen zu können, wodurch die Relevanz einer großen Bandbreite an Molekülen analysiert werden kann.

## **4.2 Die Rolle von ICOS/ICOS-L in der Interaktion von T- und B-Zellen**

### **4.2.1 Einfluss auf die klonale Expansion antigenspezifischer T- und B-Zellen**

Einer der ersten Defekte, der in Abwesenheit des ICOS-Rezeptors von mehreren Gruppen übereinstimmend beschrieben wurde, ist die verminderte Fähigkeit von T-Zellen *in vitro* (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999; McAdam, 2000; Dong, 2001) aber auch *in vivo* (Dong, 2001) infolge eines antigenen Stimulus zu proliferieren. Im Einklang mit diesen publizierten Daten konnten auch wir eine

stark verminderte Expansion der OVA-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten aber auch in der Lunge nach Immunisierung feststellen, wenn ICOS in der gesamten Maus (KO-Gruppe) fehlte (Abbildung 13B). Wir konnten jedoch erstmalig zeigen, dass dieser Defekt in der T-Zell-Expansion ausschließlich auf die fehlende Kostimulation über ICOS in der Interaktion der T-Zellen mit Dendritischen Zellen (DZ) zurückzuführen ist und die alleinige Abwesenheit des Liganden auf antigenspezifischen B-Zellen keine negative Auswirkung auf die T-Zell-Expansion zeigt (Abbildung 17). Unklar bleibt dennoch, über welche Mechanismen dieser frühe Expansionsdefekt vermittelt wird. Die Expression von Interleukin-2, einem Zytokin, das für die klonale T-Zell-Expansion wichtig ist (Gordon, 1965), wird durch ICOS nicht beeinflusst (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999; McAdam, 2001; Burmeister, 2008). Auch CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2R), die von aktivierten T-Zellen hochreguliert werden muss, um die Affinität des IL-2R für IL-2 zu steigern (Cerdan, 1995), wird in Abwesenheit von ICOS vergleichbar stark gebildet (Burmeister, 2009; Lischke, 2012). Eine verminderte Proliferation dieser Zellen ist damit eher unwahrscheinlich und wird durch Erkenntnisse von Smith und Kollegen gestützt, die berichten, dass die Gabe eines ICOS-blockierenden Antikörpers die *in vivo* T-Zell-Teilung nicht beeinträchtigt (Smith, 2003). Neuere Erkenntnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass T-Zellen, die in Abwesenheit der ICOS-Signalgebung aktiviert worden sind, verstärkt in Apoptose gehen (Burmeister, 2008). Der positive Beitrag, den die ICOS-Kostimulation zur T-Zell-Expansion leistet, ist dabei nicht nur auf die frühe Immunantwort beschränkt. In Abwesenheit der ICOS-Kostimulation sind selbst *in vitro* T<sub>H</sub>2-polarisierte T-Effektorzellen nicht in der Lage, *in vivo* ausreichend zu expandieren (Abbildung 15B). Diese Erkenntnis steht im Einklang mit der schon sehr frühzeitig gemachten Beobachtung, dass neben aktivierten T-Effektorzellen auch ruhende T-Gedächtniszellen durch eine besonders hohe Expression von ICOS gekennzeichnet sind (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999). Basierend darauf wurde angenommen, dass die Kostimulation über ICOS auch für die sekundäre Immunantwort von Bedeutung ist. In Übereinstimmung dazu weisen ICOS KO Mäuse eine substanzuell reduzierte Population an CD62L<sup>niedrig</sup> CD44<sup>hoch</sup> exprimierenden T-Gedächtniszellen auf (Burmeister, 2008).

Die Bedeutung der ICOS-Kostimulation für die Expansion antigenspezifischer B-Zellen wurde bisher nur wenig untersucht. Analog zu den T-Zellen sind auch die antigenspezifischen B-Zellen im Lymphknoten und in der Lunge in ihrer Expansion stark beeinträchtigt, wenn die Kostimulation über ICOS fehlt (Abbildung 13B). Erneut ließ sich dabei kein Einfluss der T-B-Interaktion über ICOS erkennen (Abbildung 17). Dieses Ergebnis bestätigt die durch Smith und Kollegen gemachten Erkenntnisse. Unter Verwendung eines vergleichbaren adoptiven Doppeltransfersystems konnten sie zeigen, dass HEL (*hen egg lysozyme*)-spezifische B-Zellen nach *in vivo* Blockade des ICOS-Rezeptors im Verlauf der Immunantwort schlechter expandierten (Smith, 2003). Die Autoren führten die

verminderte klonale B-Zell-Expansion auf eine verminderte T-Zell-Hilfe und beeinträchtigte T-B-Kooperation zurück, konnten jedoch nicht ausschließen, dass die reduzierte T-Zellzahl indirekt ursächlich für den beobachteten Effekt ist. Die hier beschriebenen Daten zeigen deutlich, dass die Interaktion antigenspezifischer T- und B-Zellen über ICOS keinen direkten Beitrag für die klonale B-Zell-Expansion leistet und die Ursache sehr wahrscheinlich in der verminderten T-Zellzahl zu finden ist, die bereits durch die beeinträchtigte T-DZ-Interaktion hervorgerufen wird.

#### **4.2.2 Einfluss auf die Differenzierung zu Follikulären T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen**

Wie eingangs bereits ausführlich beschrieben wurde (siehe Abschnitt 1.3.3) sind Follikuläre T-Helferzellen grundlegend für die Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen und damit für die Etablierung einer adaptiven, humoralen Immunantwort. Die Beziehung zwischen  $T_{FH}$ - und KZB-Zellen ist dabei keinesfalls eindimensional und so ist allgemein akzeptiert, dass sich beide Zellarten in ihrer Entstehung und/oder Aufrechterhaltung wechselseitig beeinflussen (Haynes, 2007; Cannons, 2010; Goenka, 2011; Baumjohann, 2011). Bereits die initialen Studien zur Rolle von ICOS ließen vermuten, dass ICOS für die Differenzierung von Follikulären T-Helferzellen und Keimzentrums-B-Zellen wichtig ist. So ergab die histologische Analyse verschiedener lymphoider Organe, dass eine ICOS-Expression besonders in Keimzentrumsstrukturen zu finden ist (Hutloff, 1999). In Übereinstimmung damit wiesen ICOS KO Mäuse nach Immunisierung nicht nur weniger, sondern zeitgleich auch kleinere Keimzentren auf (Dong, 2001; Tafuri, 2001; McAdam, 2001; Mak, 2003). Des Weiteren ergab die Analyse des peripheren Blutes von ICOS-defizienten Patienten eine nahezu komplette Abwesenheit von  $CXCR5^+$  T-Zellen, die in gesunden Probanden 5-15 % aller  $CD45RO^+ CD4^+$  T-Effektorzellen ausmachten (Bossaller, 2006). Die durch Vinuesa und Kollegen identifizierte *sanroque* Mutation, die mit einer Überexpression von ICOS verbunden war, führte zum Auftreten von Autoimmunität in den betroffenen Mäusen. Als Ursache konnten sie eine überschießende T-Helferzell-Antwort nachweisen, die mit einer exzessiven Keimzentrumsbildung verbunden war (Vinuesa, 2005). Diese Berichte machen deutlich, dass eine direkte Korrelation zwischen der Kostimulation über ICOS und der Differenzierung von T-Zellen zu Follikulären T-Helferzellen besteht, die sich direkt oder indirekt auch auf die Bildung von Keimzentren auswirkt. In welchem Maße Dendritische Zellen und B-Zellen im Einzelnen über die ICOS-Kostimulation auf diese Differenzierungsprogramme Einfluss nehmen, ist Bestandteil aktueller Forschung und sollte auch im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

Akiba und Kollegen konnten erstmals durchflusszytometrisch zeigen, dass die Generierung von  $B220^+ PNA^+$  Keimzentrums-B-Zellen sowie  $CD4^+ CXCR5^+$  Follikulären T-Helferzellen deutlich

beeinträchtigt ist, wenn ICOS-L nach Immunisierung der Tiere *in vivo* blockiert wurde (Akiba, 2005). Darüber hinaus hatte der adoptive Transfer naiver T- und B-Zellen in SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäuse, die durch das Fehlen von T- und B-Zellen, nicht aber Dendritischen Zellen gekennzeichnet waren, in Abwesenheit der ICOS-Signalgebung eine Reduktion der T<sub>FH</sub>- und KZB-Zellfrequenz zur Folge. Der alleinige Transfer von T-Zellen ohne B-Zellen ließ ebenfalls deutlich geringere Frequenzen an T<sub>FH</sub>-Zellen erkennen. Sie schlussfolgerten daraus, dass die T-B-Kooperation über ICOS wichtig ist, um die Differenzierung der T-Zellen zu T<sub>FH</sub>-Zellen zu induzieren und die reduzierte Frequenz an T<sub>FH</sub>-Zellen in einer verminderten Keimzentrumsreaktion mündet. Choi und Kollegen beschrieben erst kürzlich, dass auch die Frequenz bereits entstandener T<sub>FH</sub>-Zellen durch späte Blockade des ICOS-Signalweges noch negativ beeinflusst werden kann (Choi, 2011). Sie mutmaßten, dass die Kostimulation über ICOS zwischen T- und B-Zellen dafür verantwortlich ist. So postulierten sie, dass Dendritische Zellen und B-Zellen beide einen Beitrag über ICOS zur T<sub>FH</sub>-Zell-Differenzierung leisten, der nicht redundant ist. Das grundlegende Problem beider Arbeiten besteht jedoch darin, dass die Verwendung von ICOS-L-blockierenden Antikörpern dazu führt, dass alle ICOS-L tragenden Zellen an einer Interaktion mit ICOS tragenden Partnerzellen gehindert werden. Daher kann keine dieser Studien wirklich eindeutig zeigen, dass die beeinträchtigte T<sub>FH</sub>- und KZB-Zell-Differenzierung wirklich ein Resultat der beeinträchtigten T-B-Interaktion ist. Beobachtungen von Qi und Kollegen lassen ebenfalls Zweifel an einer Beteiligung der B-Zellen an der T<sub>FH</sub>-Zell-Differenzierung aufkommen. So führte die Abwesenheit von SAP (*signalling lymphocyte activation molecule-associated protein*), einem Molekül, das die Kontaktzeit zwischen T- und B-Zellen erhöht, lediglich zu einer verminderten Keimzentrumsreaktion. Die entstandenen SAP-defizienten T<sub>FH</sub>-Zellen waren jedoch phänotypisch nicht von WT T<sub>FH</sub>-Zellen zu unterscheiden (Qi, 2008).

Das in dieser Arbeit etablierte Doppeltransfersystem unter Nutzung von antigenspezifischen ICOS-L KO B-Zellen machte es möglich, die Effekte der ICOS-Kostimulation zwischen T- und B-Zellen isoliert zu betrachten. Die Abwesenheit von ICOS führte auch in diesem Modellsystem zu stark reduzierten Frequenzen an CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Follikulären T-Helferzellen (Haynes, 2007) und PNA<sup>+</sup> GL7<sup>+</sup> Keimzentrums-B-Zellen (Kosco, 1988; Han, 1996) im Lymphknoten (Abbildung 14). Erneut ließ sich der Differenzierungsdefekt eindeutig auf die fehlende ICOS-Kostimulation zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen zurückführen (Abbildung 18 und Abbildung 19). Antigen-spezifische B-Zellen dagegen leisteten keinen Beitrag über ICOS für die Differenzierung zu T<sub>FH</sub>- und KZB-Zellen und so konnte auch der Transfer von WT B-Zellen in ICOS-L KO Mäuse den Phänotyp nicht retten (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Bcl-6-Expression in beiden Zellarten ließ keine Unterschiede zum WT erkennen. Die wenigen T<sub>FH</sub>- und KZB-Zellen, die in Abwesenheit von ICOS-L auf DZ entstanden sind, bildeten vergleichbare Mengen an Bcl-6-Protein pro Zelle

(Abbildung 18 und Abbildung 19). Bcl-6 ist in Keimzentrums-B-Zellen besonders stark exprimiert (Cattoretti, 1995; Onizuka, 1995) und auch Follikuläre T-Helferzellen lassen sich, wie erst kürzlich beschrieben wurde, über die Expression von Bcl-6 definieren (Nurieva, 2009; Johnston 2009; Yu, 2009). Die Abwesenheit von Bcl-6 resultiert in einem vollständigen Verlust von T<sub>FH</sub>- und KZB-Zellen (Ye, 1997; Fukuda, 1997; Yu, 2009). Des Weiteren konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, dass die alleinige Expression von Bcl-6 ausreichend ist, um eine T-Zelle mit allen notwendigen Eigenschaften auszustatten, die eine Follikuläre T-Helferzelle besitzen muss (Yu, 2009; Johnston, 2009; Nurieva, 2009). Vergleichbar dazu führte die Überexpression von Bcl-6 in B-Zellen zu einer verstärkten Differenzierung dieser Zellen hin zu Keimzentrums-B-Zellen (Cattoretti, 2005). Dies zeigt, dass die Expression von Bcl-6 allein die Identität der T<sub>FH</sub>- und KZB-Zellen bestimmt, und die fehlende ICOS-Kostimulation zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen einen quantitativen, nicht aber qualitativen Defekt nach sich zieht. Diese Daten stehen im Einklang mit Beobachtungen von Yu und Kollegen, die zeigen konnten, dass eine erhöhte Expression von Bcl-6 die ICOS-Expression nicht steigert und auch Bcl-6-defiziente T-Zellen ICOS unbeeinträchtigt exprimieren können (Yu, 2009). Da durch die reduzierte Frequenz an Follikulären T-Helferzellen weniger B-Zell-Hilfe zur Verfügung steht, ist auch die Frequenz an Keimzentrums-B-Zellen reduziert. Die erhaltenen Daten widersprechen somit der gegenwärtigen Vorstellung, dass die ICOS-Signalgebung im Kontakt der T-Zellen mit antigenspezifischen B-Zellen einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des T<sub>FH</sub>-Zell-Phänotyps leistet (Akiba, 2005; Nurieva, 2008; Choi, 2011), schließen aber nicht aus, dass andere Molekülinteraktionspaare eine Rolle spielen. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist möglicherweise in der Verwendung ICOS-L-blockierender Antikörper zu finden. Deren Einsatz führt, wie bereits erwähnt, zur Blockade des Liganden auf allen antigenpräsentierenden Zellen. Dendritische Zellen finden sich jedoch auch im B-Zell-Follikel in engem Kontakt mit T- und B-Zellen (Grouard, 1996). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass Dendritische Zellen auch über ihre Funktion als Initiatoren einer primären, T-Zell-abhängigen Immunantwort hinaus noch Bedeutung für den Fortgang der Immunantwort haben und auch im B-Zell-Follikel Interaktionen mit T<sub>FH</sub>-Zellen über ICOS eingehen. Die Blockade des Liganden ermöglicht es damit nicht, den konkreten Beitrag der antigenspezifischen B-Zellen zu analysieren.

### 4.2.3 Einfluss auf die Entstehung von T- und B-Effektorzellen

Die *in vitro* Kostimulation über ICOS führte, wie im murinen und humanen System übereinstimmend gezeigt werden konnte, zu einer gesteigerten Expression von IL-4, IL-5 und IFN- $\gamma$  durch T-Zellen. Die Sekretion von IL-2 dagegen wurde durch ICOS nicht induziert (Hutloff, 1999; Yoshinaga, 1999; Coyle, 2000). Darüber hinaus waren ICOS-kostimierte T-Zellen verstärkt in der Lage, IL-10

freizusetzen (Hutloff, 1999). Löhning und Kollegen postulierten, dass die Stärke der ICOS-Expression mit der Fähigkeit einer T-Zelle einhergeht, bestimmte Zytokine zu sekretieren (Löhning, 2003). Nur ICOS<sup>hoch</sup> exprimierende T-Zellen sind demnach fähig, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 zu produzieren, wohingegen ein mittleres ICOS-Expressionsniveau mit der Sekretion von IL-4, -5 und -13 korreliert. ICOS<sup>niedrig</sup> exprimierende T-Zellen dagegen sind u.a. durch die Expression von IFN- $\gamma$  gekennzeichnet. Obwohl eine ganze Bandbreite verschiedener Zytokine durch die Kostimulation über ICOS in T-Zellen induziert werden konnte, führte die Abwesenheit der ICOS-Signalgebung zu einer selektiven Beeinträchtigung der Sekretion von IL-4 und IL-5. Andere Zytokine wie beispielsweise IFN- $\gamma$  blieben unbeeinträchtigt (Dong, 2001; Tafuri, 2001). Diese Beobachtungen, zusammen mit der Tatsache, dass ICOS KO Mäuse geringere Level an IgG1 und IgE aufwiesen, führten zu der Annahme, dass insbesondere T<sub>H</sub>2-Effektorzellen von der Kostimulation über ICOS abhängig seien (Dong, 2001; Tafuri, 2001). Diese Hypothese wurde durch eine Reihe von Publikationen noch zusätzlich gestärkt (McAdam, 2000; Coyle, 2000; Nurieva, 2003). Trotzdem blieb die Relevanz von ICOS für T<sub>H</sub>2-Effektorzellen ungeklärt. Die Mehrheit der Berichte stützt sich auf Daten, die durch Messung von Zytokinen im Zellkulturüberstand *in vitro* restimulierter T-Zellen, unter An- und Abwesenheit des ICOS-Signals erhalten wurden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss der ICOS-Kostimulation auf die Zytokinproduktion auf Einzelzellebene untersucht werden. Dadurch war es möglich, Unterschiede, die ausschließlich auf die verminderte T-Zell-Expansion zurückzuführen sind (siehe Abschnitt 3.2.2), von der Analyse auszuschließen.

*In vitro* restimierte, antigenspezifische T-Zellen aus der Lunge zeigten ein vermindertes Potential, zu IL-5, IL-13 und IL-10 produzierenden T-Zellen zu differenzieren, wenn das ICOS-Signal bereits in der frühen T-DZ-Interaktion fehlte (Abbildung 21A). Interessanterweise ließ sich dabei erstmalig auch ein Einfluss der T-B-Interaktion über ICOS feststellen. T-Zellen, die durch antigenspezifische B-Zellen kein Signal über ICOS erhielten, differenzierten deutlich weniger zu T<sub>H</sub>2-Zytokinproduzenten (Abbildung 21A). Im Unterschied zu publizierten Daten (McAdam, 2000; Dong, 2001; Tafuri, 2001; Nurieva, 2003) konnte jedoch kein Einfluss auf die Differenzierung zu IL-4-Produzenten festgestellt werden (Abbildung 21A und Daten nicht gezeigt). Nicht auszuschließen ist jedoch, dass dieser Unterschied aus der vorangegangenen *in vitro* T<sub>H</sub>2-Polarisierung der T-Zellen resultiert. So ist berichtet worden, dass der IL-4-Defekt durch exogen zugeführtes IL-4 und bei zeitgleicher Blockade von IFN- $\gamma$  aufgehoben werden kann (Dong, 2001). Vermittelt wird dies durch den Transkriptionsfaktor c-Maf, dessen Transkription u.a. von IL-4 abhängig ist (Nurieva, 2003). Nurieva und Kollegen konnten zeigen, dass ICOS die initiale Produktion von IL-4 in T-Zellen erhöht und ICOS KO T-Zellen weniger c-Maf exprimieren (Nurieva, 2003). Exogen zugesetztes IL-4 konnte das fehlende initiale IL-4-Signal ausgleichen und die c-Maf-Expression in ICOS KO T-Zellen

wiederherstellen. Infolgedessen wurde über eine positive Rückkopplung die weitere IL-4-Produktion angetrieben (Nurieva, 2003). Ergänzt wurde dieser Bericht durch eine spätere Arbeit von Bauquet und Kollegen, die den Beweis erbrachten, dass ICOS c-Maf auch direkt reguliert (Bauquet, 2009). Eine Besonderheit zeigte sich in Bezug auf die Produktion von IFN- $\gamma$ . T-Zellen, die *in vivo* durch Dendritische Zellen in Abwesenheit von ICOS aktiviert worden sind, entwickelten sich verstärkt zu IFN- $\gamma$  produzierenden T-Effektorzellen (Abbildung 21A). Diese Daten spiegeln wieder, was McAdam und Kollegen beobachten konnten. Sie berichteten von einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Produktion bei zeitgleich verminderter Produktion von IL-4 durch T-Zellen, die *in vitro* in Anwesenheit eines ICOS-Fusionsproteins restimuliert worden sind (McAdam, 2000; McAdam 2001). Aber auch andere Gruppen konnten eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion durch T-Zellen in Abwesenheit der ICOS-Kostimulation feststellen (Gonzalo, 2001; Guo, 2001). Die weiterführende Analyse auf GATA-3, den Mastertranskriptionsfaktor von T<sub>H</sub>2-Zellen (Zhang, 1997; Zheng und Flavell, 1997), zeigte deutlich, dass die fehlende Kostimulation über ICOS generell eine Minderung der GATA-3-Proteinexpression in T-Effektorzellen der Lunge verursachte (Abbildung 21B). GATA-3 ist notwendig und ausreichend, um die Differenzierung der T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Effektorzellen zu bewirken und es konnte gezeigt werden, dass GATA-3 die Expression von IL-5, nicht aber IL-4 induziert (Zhang, 1997; Lee, 2000). Die Expression von GATA-3 selbst wird zwar durch IL-4 induziert (Kurata, 1999), dessen Aufrechterhaltung ist jedoch von IL-4 unabhängig (Ouyang, 1998; Nurieva, 2003). Des Weiteren ist GATA-3 in der Lage, die Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen über einen IL-4-unabhängigen Mechanismus zu inhibieren (Ouyang, 1998). Unter Einbezug aller Fakten kann die verstärkte IFN- $\gamma$ -Produktion in der KO-Gruppe erklärt werden. Die Abwesenheit der Kostimulation über ICOS führt zu einer verminderten Proteinexpression von GATA-3 in T-Zellen. Infolgedessen wird weniger IL-5 und IL-13 und zeitgleich mehr IFN- $\gamma$  von T-Zellen produziert. Über welchen molekularen Mechanismus ICOS die Aufrechterhaltung der GATA-3-Expression bewirkt, ist gegenwärtig nicht bekannt, jedoch lassen neuere Erkenntnisse von Cook und Kollegen einige Spekulationen zu (Cook, 2010). Sie konnten zeigen, dass die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signalgebung über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) die GATA-3 Expression zwar nicht auf transkriptioneller, wohl aber translationeller Ebene reguliert. Passend dazu wurde auch für ICOS eine PI3K-vermittelte Signalgebung gezeigt, die das TZR-vermittelte Signal verstärkt (Coyle, 2000; Arimura, 2002; Fos, 2008; Gigoux, 2009). So ist denkbar, dass ICOS, PI3K-vermittelt, einen positiven Beitrag zur GATA-3-Proteinexpression leistet. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit denen von Nurieva und Kollegen, die auf transkriptioneller Ebene in ICOS KO Mäusen keine Unterschiede für GATA-3 beobachten konnten (Nurieva, 2003). Die Proteinexpression von GATA-3 dagegen untersuchten sie nicht.

Trotz der vergleichbaren Reduktion an IL-5, IL-13 und IL-10 produzierenden T-Effektorzellen, die in beiden KO-Gruppen beobachtet werden konnte, zeigte sich kein Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -Produktion, wenn ICOS-L nur auf antigenspezifischen B-Zellen fehlte (Abbildung 21A). Einen möglichen Erklärungsansatz liefern Cook und Kollegen, die berichteten, dass bereits kleine Änderungen im GATA-3-Expressionslevel dramatische Auswirkungen auf das Schicksal einer T-Zelle haben können (Cook, 2010). Eine geringere Expression des GATA-3-Proteins in Menschen, die nur ein funktionelles GATA-3-Allel besitzen, hatte starke Auswirkungen auf die T<sub>H</sub>2-Differenzierung und -Effektorfunktionen (Skapenko, 2004). Basierend auf den erhaltenen Daten ist vorstellbar, dass Dendritische Zellen und auch B-Zellen beide einen Beitrag über ICOS-L für die Aufrechterhaltung der GATA-3-Expression in T<sub>H</sub>2-Zellen leisten. Die Abwesenheit des Liganden nur auf B-Zellen führt somit zu einer verringerten GATA-3-Expression (Abbildung 21B), die jedoch vielleicht erst im Zusammenspiel mit der fehlenden ICOS-Kostimulation über Dendritische Zellen einen bestimmten Schwellenwert unterschreitet. Möglicherweise gelingt es erst dann, die suppressive Wirkung von GATA-3 auf IFN- $\gamma$  (Ouyang, 1998) aufzuheben, wodurch erst dann der Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen ansteigt. Im Einklang mit dieser Hypothese steht, dass in der KO-Gruppe im Vergleich zur B-KO-Gruppe ein noch stärkerer Effekt auf die GATA-3-Proteinexpression zu beobachten war (Abbildung 21B). Die vorliegenden Daten lassen sich damit sehr gut in bereits publizierte Erkenntnisse eingliedern und helfen, die molekularen Mechanismen besser zu verstehen. ICOS ist somit für die Aufrechterhaltung von T<sub>H</sub>2-Effektorfunktionen im entzündeten, peripheren Gewebe wichtig, wengleich auch die Bedeutung von ICOS für die T<sub>H</sub>2-Differenzierung in diesem Modellsystem nicht untersucht werden konnte. Die Beobachtung, dass ICOS KO Mäuse eine höhere Anfälligkeit für die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) besitzen, ging mit einer gesteigerten IFN- $\gamma$ -Produktion durch ICOS KO T-Zellen einher (Dong, 2001). Ähnliche Beobachtungen konnten auch Rottman und Kollegen machen, wenn sie an EAE erkrankten Mäusen einen gegen ICOS gerichteten, blockierenden Antikörper verabreichten (Rottman, 2001). Auch sie schlussfolgerten, dass durch die Blockade der ICOS-Kostimulation eine Verschiebung des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses in Richtung T<sub>H</sub>1 erreicht wird, die dazu führt, dass sich die klinischen Symptome der T<sub>H</sub>1-vermittelten Erkrankung verstärken.

Der Unterschied, der bezüglich der GATA-3-Proteinexpression in T-Zellen der Lunge zu finden war, zeigte sich interessanterweise nicht im Lymphknoten (Abbildung 21B). Einhergehend damit wurde der Großteil der Effektorzytokine ausschließlich von T-Zellen im Gewebe produziert (Abbildung 20). Unterschiede, die bezüglich der Zytokinexpression beobachtet werden konnten, traten im Lymphknoten nicht auf (Daten nicht gezeigt). Wie durch Kurzzeitproliferationsstudien (Einbau von BrdU) ermittelt worden ist, konnte die verstärkte Zytokinproduktion im Gewebe nicht auf eine stärkere, lokale Expansion und damit Differenzierung der T-Zellen zurückgeführt werden (Daten nicht



gezeigt). Im Gegenteil, T-Effektorzellen, die in der Lunge residierten, wiesen im Vergleich zu T-Zellen im Lymphknoten eine verminderte Fähigkeit auf, zu proliferieren (Daten nicht gezeigt). Harris und Kollegen, die sich zum Ziel setzten, das Schicksal von T-Effektorzellen in lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen zu untersuchen, stellten ebenfalls fest, dass T-Zellen in der Lunge unfähig waren zu proliferieren und dennoch Effektorfunktionen ausüben konnten (Harris, 2002). Zusammengefasst wird dadurch deutlich, dass sich T-Zellen im lymphoiden Organ hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen von denen in der Lunge unterscheiden und es ist vorstellbar, dass die Entscheidung einer T-Zelle, den Lymphknoten zu verlassen, einen bestimmten Differenzierungsgrad dieser T-Zelle voraussetzt.

Die Bedeutung der ICOS-Kostimulation für das Leben einer B-Effektorzelle wurde bislang weitaus weniger gut untersucht. Trotzdem wird die fehlende Kostimulation über ICOS nahezu ausschließlich mit einem B-Zell-Differenzierungsdefekt in Verbindung gebracht, der sich häufig auf die Beobachtung gründet, dass ICOS KO und ICOS-L KO Tiere geringere Immunglobulinlevel im Serum aufweisen (Tafari, 2001; Dong, 2001; McAdam, 2001; Mak, 2003; Nurieva, 2003). Die Tatsache, dass zusätzlich auch die Keimzentrumsbildung in KO-Mäusen beeinträchtigt ist und T-Zell-unabhängige Immunantworten ohne Einschränkung ablaufen können (McAdam, 2001; Tafari, 2001; Mak, 2003), verleitete viele Autoren dazu, zu proklamieren, dass die Kostimulation über ICOS besonders in der Interaktion von T- und B-Zellen wichtig ist, ohne jemals einen direkten Beweis dafür geliefert zu haben. Wie in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden konnte, führte die Abwesenheit von ICOS in der frühen T-DZ-Interaktion zu einer verminderten klonalen B-Zell-Expansion (Abbildung 13 und Abbildung 17). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verminderte Immunglobulinmenge im Serum von KO-Mäusen ausschließlich auf einem Expansionsdefekt beruht und weniger auf der Unfähigkeit der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen zu differenzieren. Mature, naive und damit antigenunerfahrene B-Zellen sind durch die parallele Expression von Oberflächen-IgD und -IgM gekennzeichnet, welche sie nach Aktivierung zugunsten anderer Immunglobulinisotypen herunterregulieren (Abney, 1978). Die Herunterregulation beider Oberflächenmarker kann daher als Zeichen der Aktivierung angesehen werden. Die Frequenz an IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> antigenspezifischen B-Zellen im Lymphknoten war deutlich reduziert, wenn die frühe T-DZ-Interaktion in Abwesenheit der ICOS-Kostimulation erfolgte, dagegen unverändert, wenn ICOS-L nur auf B-Zellen fehlte (Abbildung 24A). Damit wird deutlich, dass ICOS in der T-B-Interaktion unbedeutend für die Aktivierung der B-Zellen ist. Ein Teil der antigenspezifischen B-Zellen wird jedoch auch in Abwesenheit der ICOS-Kostimulation zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen aktiviert (Abbildung 24A). Daher ist es prinzipiell möglich, dass auch diese Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Plasmazellen, die anhand der Expression des Zelloberflächenmoleküls CD138

identifiziert werden können (Sanderson, 1989), haben sich unabhängig von einer Kostimulation über ICOS in allen drei Gruppen gleich stark gebildet (Abbildung 24B). Wie an früherer Stelle bereits ausführlich beschrieben wurde, können sich Plasmazellen auf follikulärem oder extrafollikulärem Wege bilden (siehe Abschnitt 1.4). Da die Differenzierung zu Keimzentrums-B-Zellen in der KO-Gruppe stark beeinträchtigt war (Abbildung 19A), kann vermutet werden, dass die in der KO-Gruppe entstandenen Plasmazellen verstärkt aus einer extrafollikulären Plasmazellantwort resultieren. Bis dato existieren jedoch keine spezifischen Marker, die es erlauben, extrafollikuläre von follikulären Plasmazellen durchflusszytometrisch zu unterscheiden. Aus diesem Grund kann nicht gesagt werden, auf welchem Wege die NP-spezifischen Plasmazellen entstanden sind. Unabhängig davon, resultiert allein schon der Expansionsdefekt der B-Zellen, der durch die Abwesenheit der ICOS-Signalgebung in der frühen T-DZ-Interaktion entsteht, in einer verminderten absoluten Zahl an Plasmazellen (Abbildung 24C), die durchaus ursächlich für die verminderten Serumimmunglobulinmengen in den KO-Tieren sein kann.

Der Verlust der Oberflächenexpression von IgD und IgM (Abbildung 23A) kann ein Indiz dafür sein, dass ein Immunglobulin-Klassenwechsel vollzogen wurde. Das Vermögen einer B-Zelle im Laufe der Immunantwort den Immunglobulinisotypen zu wechseln, bestimmt ihre biologische Funktion. So sind unterschiedliche Isotypen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen verbunden. Die Art des Isotypwechsels wird dabei maßgeblich durch die von T-Zellen freigesetzten Zytokine bestimmt, wobei IL-4 den Isotypwechsel nach IgE und IgG1, IFN- $\gamma$  den Wechsel nach IgG2a und TGF- $\beta$  den Wechsel nach IgA induzieren kann (Snapper, 1987; Cazac, 2000). Die Menge an Immunglobulin im Serum muss nicht zwangsweise mit der Zahl an antikörperproduzierenden Plasmazellen korrelieren (Shih, 2002). Daher lässt sich umgekehrt von der Menge an Serumimmunglobulin auch kein Rückschluss auf die Zahl an antikörperproduzierenden Plasmazellen ziehen. Ungeachtet dessen wurde eine fehlende ICOS-Kostimulation oft mit einem beeinträchtigten Isotypwechsel in Verbindung gebracht (McAdam, 2001; Tafuri, 2001).

Bedingt durch die mukosale, T<sub>H</sub>2-gerichtete Immunantwort konnten IgG1 und IgA als die dominierenden Immunglobulin-Isotypen detektiert werden. Immunglobulin E<sup>+</sup> B-Zellen fanden sich in nur geringen Frequenzen im Lymphknoten vor (Abbildung 24). Innerhalb der antigenspezifischen B-Zell-Population war die Frequenz an IgE<sup>+</sup> B-Zellen deutlich reduziert, wenn ICOS-L auf Dendritischen Zellen fehlte. Begründet durch die sehr geringe Frequenz an IgE<sup>+</sup> Plasmazellen, ist ein Unterschied in der KO-Gruppe auf der Ebene der Gesamtpopulation an Plasmazellen nicht sichtbar (Abbildung 23B). Interleukin-4, welches den Isotypwechsel nach IgE induziert, wurde jedoch unabhängig von einer Kostimulation über ICOS durch T-Zellen auf Einzelzellbasis vergleichbar stark gebildet (Abbildung 21A). Hinzu kommt, dass der Isotypwechsel nach IgG1, welcher ebenso durch

IL-4 induziert wird, in Abwesenheit von ICOS-L auf Dendritischen Zellen unbeeinträchtigt blieb (Abbildung 24). Demnach kann angenommen werden, dass der Isotypwechsel nach IgE *per se* möglich ist, jedoch nicht auf Ebene der IL-4-Sekretion reguliert wird. Es müssen weitere selektive Regulationsmechanismen für den Isotypwechsel nach IgE existieren, die über die Sekretion von IL-4 hinausgehen. Tatsächlich ist eine Reihe von negativen Regulationsmechanismen beschrieben, die dazu dienen, die Menge an IgE im Serum gering zu halten (Geha, 2003). Bcl-6, der Mastertranskriptionsfaktor von Keimzentrums-B-Zellen, wurde von verschiedenen Gruppen in Verbindung mit einer Regulation des Isotypwechsels nach IgE gebracht (Harris, 1999; Zhang, 2012). So postulierten alle Berichte übereinstimmend, dass der Isotypwechsel nach IgE von der Menge an Bcl-6-Protein reguliert wird und eine Minderung der Bcl-6-Expression mit einem verstärkten Klassenwechsel nach IgE einhergeht. In Übereinstimmung damit konnte in IL-21-Rezeptor (IL-21R) KO Mäusen eine erhöhte Menge an IgE im Serum festgestellt werden (Ozaki, 2002), die sehr wahrscheinlich durch die verringerte Bcl-6-Expression in Abwesenheit der IL-21-Signalgebung verursacht wurde (Linterman, 2010). Wie jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führte die fehlende ICOS-Signalgebung in der T-DZ-Interaktion zwar zur einer verminderten Differenzierung der B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen, die Menge an Bcl-6-Protein pro Zelle war jedoch zum WT unverändert (Abbildung 19B). Eine Bcl-6-vermittelte Suppression des IgE-Klassenwechsels kann somit ausgeschlossen werden. Sugai und Kollegen berichteten von dem Repressorprotein Id2 (*inhibitor of DNA binding/differentiation*), das, TGF- $\beta$ -vermittelt, den Klassenwechsel nach IgE, nicht aber IgG1 kontrolliert (Sugai, 2002). Immunglobulin A, dessen Klassenwechsel ebenfalls durch TGF- $\beta$  induziert werden kann (Sonoda, 1989), war unter Abwesenheit der ICOS-Signalgebung zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen jedoch nicht erhöht (Abbildung 24), sodass auch dieser Mechanismus keine plausible Erklärung für die verminderte Frequenz an IgE<sup>+</sup> B-Zellen in der KO-Gruppe liefert. Einen möglichen Erklärungsansatz liefern Xu und Rothman, die zeigen konnten, dass IFN- $\gamma$  fähig ist, den Isotypwechsel nach IgE zu inhibieren. Die Tatsache, dass IFN- $\gamma$  nur von T-Zellen in der KO-Gruppe verstärkt gebildet wurde, könnte erklären, weshalb Unterschiede im IgE-Klassenwechsel nur in der KO-Gruppe sichtbar waren (Xu und Rothman, 1994). Eine zeitgleiche Inhibition des Klassenwechsels nach IgG1, die laut Autoren ebenfalls zu sehen sein sollte, trat jedoch nicht auf. Der Defekt im IgE-Klassenwechsel, der unter Abwesenheit der ICOS-Kostimulation zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen zu beobachten war, kann gegenwärtig nicht erklärt werden. Dennoch wird deutlich, dass die fehlende ICOS-Signalgebung in der frühen T-DZ-Interaktion den Isotypwechsel nicht global, sondern sehr selektiv nur nach IgE beeinträchtigt. Bedingt durch die starke Beeinträchtigung der B-Zell-Expansion in der KO-Gruppe (Abbildung 17), finden sich auf Ebene der absoluten Zellzahlen weniger Isotyp-gewechselte Zellen, obwohl der Isotypwechsel *per se* zumindestens für IgG1 und IgA unbeeinträchtigt blieb. Wir konnten erstmals zeigen, dass die

Minderung verschiedener Immunglobulinisotypen auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden kann. So ist nur der Isotypwechsel nach IgE wirklich beeinträchtigt, die verminderte Menge an Serum-IgG1 dagegen ist sehr wahrscheinlich nur eine Folge der beeinträchtigten B-Zell-Expansion, die die Abwesenheit der ICOS-Kostimulation zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen nach sich zieht. Gestützt werden diese Daten durch Beobachtungen in ICOS-defizienten Patienten. Diese zeigten zwar ebenfalls verminderte Immunglobulinlevel im Serum, die Kapazität der B-Zellen, einen Klassenwechsel durchzuführen, war jedoch *in vitro* nicht beeinträchtigt (Grimbacher, 2003).

Überraschenderweise zeigte sich in der B-KO-Gruppe keine Beeinträchtigung des Klassenwechsels nach IgE, jedoch konnte eine Verschiebung des IgG1/IgA-Verhältnisses in Richtung IgG1 beobachtet werden (Abbildung 24). Der Klassenwechsel nach IgA wird u.a. durch TGF- $\beta$  induziert (Sonoda, 1989) und kann auch T-Zell-unabhängig erfolgen (Macpherson, 2000). Zudem wird angenommen, dass ein großer Anteil an IgA im Serum durch mucosal entstandene IgA<sup>+</sup> B-Zellen produziert wird (Cerutti, 2008). Die ICOS-Abhängigkeit, die sich in unserem Modell für den Klassenwechsel nach IgA ergibt, spricht dafür, dass dieser T-Zell-abhängig induziert wurde. Die Tatsache, dass dieser Defekt in der KO-Gruppe nicht zu beobachten war, deutet daraufhin, dass B-Zellen als ICOS-L tragende Zellen eine prominente Rolle spielen. Dies ist jedoch insofern überraschend, da eine mögliche Beteiligung von ICOS im Zusammenhang mit dem IgA-Klassenwechsel bisher nicht diskutiert wurde. Über die genauen Mechanismen, die zu der selektiven Beeinträchtigung des IgA-Klassenwechsels in der B-KO Gruppe führen, können wir gegenwärtig nur spekulieren. Aus dem humanen System ist bekannt, dass der Klassenwechsel nach IgA nicht nur direkt aus IgM<sup>+</sup> B-Zellen, sondern auch sequentiell über IgG1 erfolgen kann (Brinkmann, 1992). Der Prozess des sequentiellen Klassenwechsels nach IgA bietet eine mögliche Erklärung dafür, weshalb unter fehlender ICOS-Kostimulation zwischen T- und B-Zellen mehr IgG1<sup>+</sup> und weniger IgA<sup>+</sup> Plasmazellen erhalten werden und lässt uns spekulieren, dass die T-B-Interaktion über ICOS selektiv den sequentiellen Klassenwechsel nach IgA steuert. Fehlt die Kostimulation bereits in der frühen T-DZ-Interaktion, werden IgA<sup>+</sup> Zellen möglicherweise verstärkt auf direktem Weg gebildet, wodurch keine Defekte im IgA-Klassenwechsel in der KO-Gruppe beobachtet werden können. Ein vergleichbarer Mechanismus wurde auch für IgE beschrieben. Eine aktuelle Studie von Xiong und Kollegen beschreibt, dass der sequentielle Klassenwechsel nach IgE ein Weg sein kann, hochaffine IgE-Antikörper zu bilden. Niedrigaffine IgE-Antikörper dagegen werden auf direktem Wege gebildet (Xiong, 2012). Ein Zusammenhang mit dem Klassenwechsel nach IgA wurde von den Autoren zwar nicht diskutiert, dennoch sind ähnliche Mechanismen vorstellbar und die T-B-Interaktion über ICOS steuert möglicherweise die Generierung hochaffiner IgA<sup>+</sup> Plasmazellen.

Das selektive Fehlen von IgA im Menschen äußert sich in der primären Immundefizienz Erkrankung des selektiven IgA-Mangels. Ein Merkmal dieser Erkrankung ist, dass selektiv IgA, nicht aber IgG1,

IgM oder andere Immunglobuline beeinträchtigt sind (Cunningham-Rundles, 2001). Die molekularen Ursachen, die zu dieser Erkrankung führen, sind im Moment nur unzureichend erforscht. Doch konnten Castigli und Kollegen zeigen, dass der Klassenwechsel nach IgA in APRIL (*A proliferation-inducing ligand*)-defizienten Mäusen selektiv beeinträchtigt ist (Castigli, 2004). Sie mutmaßten, dass eine APRIL-Defizienz möglicherweise Ursache für den selektiven IgA-Mangel im Menschen sein kann. Inwiefern diese Beobachtungen in Zusammenhang mit der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung stehen, muss jedoch noch gezeigt werden.

Hinweise zur Rolle von ICOS auf die Differenzierung von B-Gedächtniszellen stammen vor allem aus dem humanen System. So konnte im peripheren Blut von SLE-Patienten eine erhöhte Anzahl an ICOS<sup>+</sup> T-Zellen und zeitgleich B-Gedächtniszellen festgestellt werden (Hutloff, 2004). Die Tatsache, dass die B-Zellen ICOS-L herunterreguliert hatten, ließ die Autoren schlussfolgern, dass die Kostimulation über ICOS maßgeblich an der überschießenden B-Zell-Antwort beteiligt sein muss. Im Einklang damit weisen ICOS-defiziente Patienten eine stark verminderte Zahl an zirkulierenden B-Zellen im Blut mit einem B-Gedächtniszell-Phänotyp auf (Grimbacher, 2003). Daten aus dem murinen System beschränken sich hauptsächlich auf die Beobachtung, dass ICOS KO Mäuse eine beeinträchtigte Keimzentrumsreaktion aufweisen und auch nach einer sekundären Immunisierung verringerte Mengen an Serumimmunglobulinen bilden (Tafari, 2001; Mak, 2003; Mahajan, 2007). Eine Analyse der B-Zellen auf Einzelzellebene erfolgte jedoch nicht.

Unter Verwendung des in dieser Arbeit etablierten Modellsystems konnte somit erstmals auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass die Kostimulation über ICOS die Differenzierung von B-Zellen zu B-Gedächtniszellen nachhaltig beeinflusst. Denn die Analyse antigenspezifischer B-Zellen aus dem Lungengewebe, die sich 28 Tage nach der letzten Antigengabe und damit in Abwesenheit einer erneuten Stimulation noch immer im selbigen finden ließen, ergab substanziell verringerte absolute B-Zellzahlen, wenn die Kostimulation über ICOS fehlte (Abbildung 25). In Anlehnung an Vikstrom und Kollegen (Vikstrom, 2010) waren die analysierten B-Gedächtniszellen dabei B220<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD138<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup> Bcl-6<sup>-</sup> (Abbildung 25 und Daten nicht gezeigt). Auffallend war die Existenz einer diskreten IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> antigenspezifischen B-Zell-Population (Abbildung 25). Wie man mittlerweile weiß, ist der Immunglobulin-Klassenwechsel keine zwingende Voraussetzung für die Bildung von B-Gedächtniszellen und so konnte, im murinen und humanen System übereinstimmend, die Existenz einer IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> B-Gedächtniszellpopulation nachgewiesen werden (Tangye, 2007; Dogan, 2009; Pape, 2011).

Obwohl ein Einfluss der ICOS-Kostimulation in der frühen T-B-Interaktion ausgeschlossen werden konnte, zeigte sich eine deutliche Reduktion an B-Gedächtniszellen in der B-KO-Gruppe, die unter zusätzlicher Abwesenheit des Liganden auf Dendritischen Zellen (KO-Gruppe) noch sehr viel stärker

ausgeprägt war (Abbildung 25). Die erhaltenen Daten stehen im Einklang mit Beobachtungen, die in ICOS-defizienten Patienten gemacht wurden und zeigen, dass die Kostimulation über ICOS zwischen T- und B-Zellen für die Generierung und/oder Aufrechterhaltung von B-Gedächtniszellen bedeutsam ist. Gegenwärtig sind die molekularen Mechanismen der B-Gedächtniszellbildung noch wenig bekannt. Neben einer Reihe verschiedenster Faktoren (Choe, 1998; Siepmann, 2001; Roy, 2002; Zotos, 2010; Good-Jacobson; 2010) wird auch immer wieder diskutiert, dass die BZR-Affinität in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielt (Smith, 1997; Phan, 2006; Le, 2008). Trotzdem bleibt unklar, welche Mechanismen die B-Gedächtniszellbildung induzieren. Als gesichert gilt jedoch, dass Bcl-6 herunterreguliert muss, um die terminale Differenzierung der B-Gedächtniszellen einzuleiten (Kuo, 2007). Ebenso unklar ist, wie B-Gedächtniszellen aufrechterhalten werden. Einige Gruppen berichteten davon, dass der permanente Kontakt mit dem Antigen und darauffolgend die Signalgebung über den BZR zwingende Voraussetzung dafür sei (Gray und Scarvall, 1988; Hikida, 2009). Andere Studien dagegen zeigten, dass B-Gedächtniszellen auch in Abwesenheit von persistierendem Antigen überleben (Maruyama, 2000). Da eine Signalgebung über ICOS-L bisher nicht beschrieben wurde, können die Effekte, die die fehlende ICOS-Kostimulation auf die Differenzierung zu bzw. Aufrechterhaltung von B-Gedächtniszellen hat, nur indirekter Natur sein. Welchen direkten Beitrag ICOS im Einzelnen in der Interaktion zwischen T- und B-Zellen sowie T-Zellen und Dendritischen Zellen dazu leistet, können wir derzeit nicht sagen, doch scheint eine vollständige Abwesenheit der ICOS-Signalgebung in der KO-Gruppe den negativen Effekt zu kumulieren. Über diesen allgemeinen B-Zell-Differenzierungsdefekt hinaus scheint die Signalgebung über ICOS zusätzlich auch die Generierung und/oder Aufrechterhaltung einzelner Immunglobulinisotypen zu regulieren und so ließen sich in Abwesenheit der ICOS-Kostimulation zusätzlich noch weniger IgA<sup>+</sup> B-Zellen finden (Abbildung 25B). Dabei war unbedeutend, ob die Kostimulation nur zwischen T- und B-Zellen oder zusätzlich noch zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen gestört war, wengleich sich auch in diesem Fall ein stärkerer Effekt in der KO-Gruppe erkennen ließ. Einhergehend mit der übergeordneten Minderung der Gesamtzahl an B-Gedächtniszellen (Abbildung 25A), ließen sich in der B-KO-Gruppe absolut nur noch wenige IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen finden. In der KO-Gruppe waren B-Zellen mit einem IgA-Phänotyp sogar fast vollständig abwesend (Abbildung 25B). Für das humane System wurde ein TGF- $\beta$ -unabhängiger, jedoch IL-5-abhängiger Mechanismus beschrieben, der den Klassenwechsel nach IgA induzieren kann (Cerutti, 1998; Cerutti, 2008). Die Tatsache, dass antigenspezifische T-Zellen im Lungengewebe weniger IL-5 produzieren, wenn die Kostimulation über ICOS fehlt (Abbildung 21A), könnte eine Erklärung für die verminderte Bildung an IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen sein. Wie bereits an früherer Stelle erwähnt, wird IgA vor allem in mucosalen Immunantworten gebildet und man geht davon aus, dass die Differenzierung von IgA<sup>+</sup> B-Zellen größtenteils lokal erfolgt. Passend dazu lässt sich eine

Beeinträchtigung der IL-5-Sekretion auch nur im Lungengewebe beobachten, sodass ICOS vermutlich die Differenzierung zu IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen im Lungengewebe indirekt über die verminderte Expression von IL-5 steuert. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass zusätzlich noch andere Faktoren eine Rolle spielen. IgA<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen waren in der KO-Gruppe fast vollständig abwesend und dieser massive Effekt kann durch die verminderte IL-5-Produktion allein nicht erklärt werden. Die vorliegenden Daten zeigen, dass ICOS in der T-B- aber auch T-DZ-Interaktion für die Generierung und/oder Aufrechterhaltung der B-Gedächtniszellen wichtig ist und beide Zell-Zell-Interaktionen gemeinschaftlich einen positiven Beitrag dazu leisten.

### **4.3 Rolle der B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen im entzündeten Gewebe**

Obwohl B-Zellen den Liganden für ICOS exprimieren, scheint ihre Relevanz als ICOS-L tragende Zellen im Vergleich zu Dendritischen Zellen, in der frühen Phase der Immunantwort, eher gering zu sein. So war die Abwesenheit des Liganden auf antigenspezifischen B-Zellen mit weitaus geringeren Defekten verbunden. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass nicht nur antigenspezifische T-Zellen, sondern auch B-Zellen im Verlauf der Entzündungsreaktion im Lungengewebe akkumulierten (Abbildung 13, Abbildung 28). Weiterhin beeinträchtigte die Abwesenheit des Liganden auf antigenspezifischen B-Zellen die Aufrechterhaltung der T<sub>H</sub>2-Effektorfunktionen im entzündeten Gewebe (Abbildung 21A). Dies legte die Vermutung nahe, dass die ICOS-Kostimulation zwischen T- und B-Zellen in der späten Phase der Immunantwort eine prominente Rolle spielt. B-Zellen können neben Dendritischen Zellen auch als antigenpräsentierende Zellen wirksam werden (siehe Abschnitt 1.6). Da im Lungengewebe neben B-Zellen auch andere antigenpräsentierende Zellen vorhanden waren (Dendritische Zellen, Makrophagen), wurde ein möglicher Einfluss von ICOS auf die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen in einem reduktionistischen *in vitro* System untersucht. Nur so war es zudem möglich, den *in vivo* Expansionsdefekt, der in Abwesenheit der ICOS-Kostimulation zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen entsteht, auszugleichen. Das Besondere an dem verwendeten experimentellen System war, dass die initiale Aktivierung der B-Zellen, die aus derselben Spendermaus (B1-8i) stammten, entweder in einer normalen (WT) oder ICOS-freien (ICOS KO) Umgebung erfolgte. Mögliche Defekte, die sich auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Spendermäuse gründen, konnten dadurch ausgeschlossen werden und waren alleinig auf die Abwesenheit der ICOS-Kostimulation zum Zeitpunkt der initialen *in vivo* B-Zell-Aktivierung zurückführbar. Prinzipiell waren die NP-spezifischen B-Zellen in der Lage, als vollwertige APZ zu fungieren, denn die Verwendung von NP-OVA anstelle von OVA-Peptid setzte die Aufnahme und Prozessierung des Proteins voraus (Abbildung 27). Eine antigenpräsentierende

Funktion von lungenresidenten B-Zellen konnte bereits durch Lindell und Kollegen nachgewiesen werden (Lindell, 2008). Die Relevanz der ICOS-Kostimulation wurde in diesem Zusammenhang bisher jedoch noch nicht untersucht. Die Abwesenheit der ICOS-Signalgebung während der initialen B-Zell-Aktivierung führte zu einer deutlichen Beeinträchtigung der antigenpräsentierenden Funktion dieser Zellen (Abbildung 27). Der Defekt in der Antigenpräsentation muss B-Zell-intrinsisch sein, da eine Interaktion der T- und B-Zellen über ICOS *in vitro* prinzipiell möglich war. B-Zellen, die in Abwesenheit von ICOS aktiviert worden sind, weisen deutliche Defekte in ihrer antigenpräsentierenden Funktion auf, die irreversibel sind und auch durch eine spätere T-Zell-Interaktion über ICOS nicht mehr kompensiert werden können. Als sicher gilt, dass kein Zusammenhang mit der Expression von MHC-II-Molekülen besteht, da die Analyse der B-Zellen nach *in vitro* Kultur eine vergleichbare MHC-II-Expression erkennen ließ (Daten nicht gezeigt). Einige Studien lassen vermuten, dass B-Zellen die T-Zell-Antwort über die Vermittlung kostimulatorischer Signale modulieren und so wurde gezeigt, dass OX40 Ligand (OX40L) auf B-Zellen wichtig ist, um T<sub>H</sub>2-Immunantworten zu verstärken (Linton, 2003). Die genauen molekularen Ursachen müssen noch gefunden werden. Die Verwendung eines ähnlichen Systems mit ICOS-L KO B-Zellen führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis, dass *in vivo* aktivierte NP-spezifische B-Zellen *in vitro* als antigenpräsentierende Zellen wirksam werden können (siehe Abschnitt 3.4.1), ließ uns spekulieren, dass sie die entsprechenden Kooperationspartner-T-Zellen bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen/Allergen lokal im Gewebe reaktivieren können. Die Bildung von tertiären lymphoiden Strukturen ist ein Indikator dafür, dass Immunantworten lokal induziert werden können (Moyron-Quiroz, 2004). So konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der Akkumulation der T- und B-Zellen nicht nur um lose Aggregationen von Zellen handelte, sondern dass in einigen zellulären Infiltraten sogenannte Bronchus-assoziierte lymphoide Strukturen vorhanden waren (Abbildung 29). Innerhalb dieser Strukturen konnten Follikuläre Dendritische Zellen (FDZ) sowie separate T- und B-Zellzonen detektiert werden (Randall, 2010). Die durchflusszytometrische Analyse Lungen-residenter B-Zellen zeigte, dass eine Subpopulation der antigenspezifischen, nicht aber endogenen B-Zellen ebenfalls über die Keimzentrummarker GL7 und PNA identifizierbar war (Abbildung 30A und Daten nicht gezeigt). Die weiterführende Phänotypisierung dieser Zellen über Bcl-6 und CD38 ließ erkennen, dass diese Zellen typische Merkmale einer Keimzentrums-B-Zelle aufweisen, indem sie durch hohe Mengen an Bcl-6 (Cattoretti, 1995; Onizuka, 1995) bei zeitgleich geringer Expression von Oberflächen-CD38 (Ridderstad und Tarlinton, 1998) gekennzeichnet waren (Abbildung 30B). Fehlte die Kostimulation über ICOS zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen, so waren deutlich weniger Keimzentrums-ähnliche B-Zellen detektierbar. Die Abwesenheit des Liganden nur auf



antigenspezifischen B-Zellen dagegen ließ keinen Unterschied zum WT erkennen (Abbildung 30A+B). Erneut ließen sich keine Unterschiede bezüglich der Bcl-6-Expression erkennen, wodurch auch hier gemutmaßt werden kann, dass funktionell keine Einschränkungen bestehen (siehe Abschnitt 4.2.2). Da die Auswanderung der KZB-Zellen aus dem Lymphknoten mit einer Herunterregulation von Bcl-6 verbunden ist, kann ausgeschlossen werden, dass Keimzentrums-B-Zellen aus dem Lymphknoten die beobachteten Effekte verursachten. Vielmehr kann vermutet werden, dass die Keimzentrums-ähnlichen B-Zellen lokal im Gewebe entstanden sind. Einhergehend damit wiesen Lymphotoxin- $\alpha$  Knock-out Mäuse, die durch ein vollständiges Fehlen sekundärlymphatischer Organe gekennzeichnet sind, nach einer Influenza-Infektion BALT Strukturen in der Lunge auf, die Keimzentrumsstrukturen erkennen ließen (Moyron-Quiroz, 2004).

Dem Phänotyp von T-Zellen in BALT Strukturen wurde bisher weitaus weniger Aufmerksamkeit geschenkt, möglicherweise deshalb, weil BALT Strukturen in vielen Fällen ausschließlich aus B-Zell-Follikeln bestehen (Randall, 2010). In unserem Modellsystem konnten jedoch diskrete Zonen antigenspezifischer T-Zellen in BALT Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 29B). Die phänotypische Charakterisierung der T-Zellen auf  $T_{FH}$ -Zellmarker ließ keine  $T_{FH}$ -Zell-Korrelate in der Lunge erkennen. So war weder eine Expression von CXCR5, noch Bcl-6 oder anderer  $T_{FH}$ -assoziierter Marker (z.B. TIGIT) auf T-Zellen zu finden (Abbildung 30C). Die zeitgleiche Anwesenheit von Keimzentrums-ähnlichen B-Zellen zeigt, dass die Abwesenheit von  $T_{FH}$ -ähnlichen T-Zellen nicht durch den Analysezeitpunkt begründet werden kann. Auffällig war die starke Hochregulation des Oberflächenmoleküls SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*), die auf T-Zellen des Lymphknotens in diesem Maße nicht zu sehen war und in allen drei Gruppen unabhängig von einer Kostimulation über ICOS gleich stark auftrat (Abbildung 30C und Daten nicht gezeigt). Da auch endogene T-Zellen in der Lunge eine erhöhte SLAM-Expression aufwiesen (Abbildung 30C), kann vermutet werden, dass die Hochregulation antigenunspezifisch verläuft und in Verbindung mit der peripheren Lokalisation der Zellen steht. SLAM besitzt vergleichbar zu ICOS kostimulatorische Eigenschaften und wird ebenfalls von naiven T-Zellen nach Aktivierung hochreguliert (Cocks, 1995). Darüber hinaus wird von einer SLAM-Expression auch auf anderen Zellen (z.B. B-Zellen) berichtet (Cocks, 1995; McCausland, 2007). Die genaue Funktion von SLAM ist bisher unbekannt, und so weisen SLAM-defiziente Mäuse keine größeren Defekte auf (Wang, 2004; McCausland, 2007). Für die Generierung von Follikulären T-Helferzellen wurde zwar eine Rolle von SLAM ausgeschlossen, die Produktion von IL-4 durch  $T_{FH}$ -Zellen soll jedoch SLAM-abhängig erfolgen (Yusuf, 2010). SLAM ist ein homophiler Rezeptor und kann somit mit SLAM-Rezeptoren auf anderen Zellen interagieren (Mavaddat, 2000). Da auch B-Zellen SLAM nach Aktivierung hochregulieren und Keimzentrums-B-Zellen durch eine besonders hohe SLAM-Expression gekennzeichnet sind (Cannons,

2010), ist es durchaus vorstellbar, dass eine T-B-Interaktion über SLAM im entzündeten Gewebe möglich ist.

Fügt man die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zu einem Gesamtbild zusammen, so ist vorstellbar, dass die Interaktion von ICOS mit seinem Liganden in der T-B-Kooperation nicht in der frühen, aber durchaus späten Phase der Immunantwort eine Rolle spielt. In Situationen, in denen antigenlimitierende Bedingungen herrschen, ist es möglich, dass B-Zellen aufgrund ihres antigenspezifischen BZR einen Vorteil als antigenpräsentierende Zellen gegenüber Dendritischen Zellen haben, weil sie geringste Mengen an Antigen spezifisch und rezeptorvermittelt aufnehmen können. Die Bildung von tertiären lymphoiden Strukturen bildet dabei die anatomische Voraussetzung dafür, dass Immunantworten lokal im Gewebe ablaufen können und macht es möglich, dass bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen/Allergen T-Gedächtniszellen lokal reaktiviert werden. Fehlt die Kostimulation über ICOS zwischen T- und B-Zellen, ist einerseits die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen beeinträchtigt, andererseits können  $T_H2$ -Effektorfunktionen nicht effizient aufrechterhalten werden. Es kommt zu einer verminderten Ausschüttung von IL-5 und IL-13, infolgedessen weniger Eosinophile ins Lungengewebe einströmen (Abbildung 22) und sich die Symptomatik der asthmatischen Erkrankung möglicherweise verbessert.

## Literaturverzeichnis

- Abney ER**, Cooper MD, Kearney JF, Lawton AR, Parkhouse RM: Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *Journal of immunology* 1978, 120(6):2041-2049.
- Abrams JS**, Roncarolo MG, Yssel H, Andersson U, Gleich GJ, Silver JE: Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development: immunoassay of IL-10 and IL-5 in clinical samples. *Immunological reviews* 1992, 127:5-24.
- Acuto O**, Michel F: CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature reviews Immunology* 2003, 3(12):939-951.
- Aicher A**, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, Magaletti D, Buckwalter S, Ledbetter JA, Clark EA: Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *Journal of immunology* 2000, 164(9):4689-4696.
- Akbari O**, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT: Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 2002, 8(9):1024-1032.
- Akiba H**, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, Ma J, Tezuka K, Yagita H, Okumura K: The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *Journal of immunology* 2005, 175(4):2340-2348.
- Allen JE**, Bischof RJ, Sucie Chang HY, Hirota JA, Hirst SJ, Inman MD, Mitzner W, Sutherland TE: Animal models of airway inflammation and airway smooth muscle remodelling in asthma. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2009, 22(5):455-465.
- Allman D**, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR, Staudt LM: BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 1996, 87(12):5257-5268
- Amsen D**, Antov A, Jankovic D, Sher A, Radtke F, Souabni A, Busslinger M, McCright B, Gridley T, Flavell RA: Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 2007, 27(1):89-99.
- Anderson SM**, Khalil A, Uduman M, Hershberg U, Louzoun Y, Haberman AM, Kleinstein SH, Shlomchik MJ: Taking advantage: high-affinity B cells in the germinal center have lower death rates, but similar rates of division, compared to low-affinity cells. *Journal of immunology* 2009, 183(11):7314-7325.
- Andersson J**, Melchers F, Galanos C, Luderitz O: The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule. *The Journal of experimental medicine* 1973, 137(4):943-953.
- Andersson J**, Moller G, Sjoberg O: Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes. *Cellular immunology* 1972, 4(4):381-393.
- Ansel KM**, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG: In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of experimental medicine* 1999, 190(8):1123-1134.

- Arimura Y**, Kato H, Dianzani U, Okamoto T, Kamekura S, Buonfiglio D, Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T, Yagi J: A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. *International immunology* 2002, 14(6):555-566.
- Baines KJ**, Simpson JL, Bowden NA, Scott RJ, Gibson PG: Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2010, 35(3):522-531.
- Banchereau J**, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392(6673):245-252.
- Barnden MJ**, Allison J, Heath WR, Carbone FR: Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology* 1998, 76(1):34-40.
- Barnes PJ**: Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews Immunology* 2008, 8(3):183-192.
- Batista FD**, Harwood NE: The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews Immunology* 2009, 9(1):15-27.
- Batista FD**, Neuberger MS: Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity* 1998, 8(6):751-759.
- Baumjohann D**, Okada T, Ansel KM: Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. *Journal of immunology* 2011, 187(5):2089-2092.
- Bauquet AT**, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK: The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nature immunology* 2009, 10(2):167-175.
- Beier KC**, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA: Induction, binding specificity and function of human ICOS. *European journal of immunology* 2000, 30(12):3707-3717.
- Beier KC**, Hutloff A, Lohning M, Kallinich T, Kroczeck RA, Hamelmann E: Inducible costimulator-positive T cells are required for allergen-induced local B-cell infiltration and antigen-specific IgE production in lung tissue. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004, 114(4):775-782.
- Bossaller L**, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, Durandy A, Baumann U, Schlesier M, Welcher AA *et al*: ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *Journal of immunology* 2006, 177(7):4927-4932.
- Breitfeld D**, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Forster R: Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine* 2000, 192(11):1545-1552.
- Bretscher P**, Cohn M: A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 1970, 169(3950):1042-1049.
- Bretscher PA**: A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96(1):185-190.

- Brinkmann V**, Muller S, Heusser CH: T cell dependent differentiation of human B cells: direct switch from IgM to IgE, and sequential switch from IgM via IgG to IgA production. *Molecular immunology* 1992, 29(10):1159-1164.
- Brodie D**, Collins AV, Iaboni A, Fennelly JA, Sparks LM, Xu XN, van der Merwe PA, Davis SJ: LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Current biology* 2000, 10(6):333-336.
- Burmeister Y**, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam KP, Coyle AJ, Kroczeck RA, Hutloff A: ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *Journal of immunology* 2008, 180(2):774-782.
- Burmeister, Y**: Die Rolle von ICOS für die T-Zell-Effektorfunktion *in vivo* (Doktorarbeit). 2009
- Butcher EC**, Rouse RV, Coffman RL, Nottenburg CN, Hardy RR, Weissman IL: Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *Journal of immunology* 1982, 129(6):2698-2707.
- Cannons JL**, Qi H, Lu KT, Dutta M, Gomez-Rodriguez J, Cheng J, Wakeland EK, Germain RN, Schwartzberg PL: Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* 2010, 32(2):253-265.
- Cassese G**, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, Muehlinghaus G, Szyska M, Radbruch A, Manz RA: Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *Journal of immunology* 2003, 171(4):1684-1690.
- Castigli E**, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS: Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(11):3903-3908.
- Cattoretti G**, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R: BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 1995, 86(1):45-53.
- Cattoretti G**, Pasqualucci L, Ballon G, Tam W, Nandula SV, Shen Q, Mo T, Murty VV, Dalla-Favera R: Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer cell* 2005, 7(5):445-455.
- Cazac BB**, Roes J: TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA *in vivo*. *Immunity* 2000, 13(4):443-451.
- Cerdan C**, Martin Y, Courcoul M, Mawas C, Birg F, Olive D: CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *Journal of immunology* 1995, 154(3):1007-1013.
- Cerutti A**: The regulation of IgA class switching. *Nature reviews Immunology* 2008, 8(6):421-434.
- Cerutti A**, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max EE, Casali P: CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *Journal of immunology* 1998, 160(5):2145-2157.
- Cervenak L**, Magyar A, Boja R, Laszlo G: Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunology letters* 2001, 78(2):89-96.
- Choe J**, Choi YS: IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *European journal of immunology* 1998, 28(2):508-515.

- Choi YS**, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, Lao C, Crotty S: ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 2011, 34(6):932-946.
- Cocks BG**, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G: A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995, 376(6537):260-263.
- Coffman RL**, Weissman IL: Immunoglobulin gene rearrangement during pre-B cell differentiation. *The Journal of molecular and cellular immunology : JMCI* 1983, 1(1):31-41.
- Cook KD**, Miller J: TCR-dependent translational control of GATA-3 enhances Th2 differentiation. *Journal of immunology* 2010, 185(6):3209-3216.
- Coyle AJ**, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA *et al*: The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 2000, 13(1):95-105.
- Coyle AJ**: The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature immunology* 2001, 2(7):605-611.
- Crawford A**, Macleod M, Schumacher T, Corlett L, Gray D: Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *Journal of immunology* 2006, 176(6):3498-3506.
- Croft M**: Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nature reviews Immunology* 2003, 3(8):609-620.
- Crotty S**: Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology* 2011, 29:621-663.
- Cunningham-Rundles C**: Physiology of IgA and IgA deficiency. *Journal of clinical immunology* 2001, 21(5):303-309.
- Dahler AC**: Die Rolle von ICOS auf die B-Zelldifferenzierung in einem in vivo Modell (Doktorarbeit). 2009
- Deenick EK**, Chan A, Ma CS, Gatto D, Schwartzberg PL, Brink R, Tangye SG: Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity* 2010, 33(2):241-253.
- Delayre-Orthez C**, de Blay F, Frossard N, Pons F: Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2004, 34(11):1789-1795.
- Dogan I**, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Megret J, Storck S, Reynaud CA, Weill JC: Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology* 2009, 10(12):1292-1299.
- Dong C**, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA: ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001, 409(6816):97-101.
- Dong C**, Martinez GJ: T cells: the usual subsets. *Nature review Immunology* (Poster) 2010, <http://www.nature.com/reviews/posters/Tcellsubsets>
- Eisenbarth SC**, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K: Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *The Journal of experimental medicine* 2002, 196(12):1645-1651.

- Epstein MM**: Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *International archives of allergy and immunology* 2004, 133(1):84-100.
- Fang TC**, Yashiro-Ohtani Y, Del Bianco C, Knoblock DM, Blacklow SC, Pear WS: Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 2007, 27(1):100-110.
- Flood-Page P**, Swenson C, Faiferman I, Matthews J, Williams M, Brannick L, Robinson D, Wenzel S, Busse W, Hansel TT *et al*: A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007, 176(11):1062-1071.
- Forster R**, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M: CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999, 99(1):23-33.
- Fos C**, Salles A, Lang V, Carrette F, Audebert S, Pastor S, Ghiotto M, Olive D, Bismuth G, Nunes JA: ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *Journal of immunology* 2008, 181(3):1969-1977.
- Frey O**, Meisel J, Hutloff A, Bonhagen K, Bruns L, Kroczeck RA, Morawietz L, Kamradt T: Inducible costimulator (ICOS) blockade inhibits accumulation of polyfunctional T helper 1/T helper 17 cells and mitigates autoimmune arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2010, 69(8):1495-1501.
- Fukuda T**, Yoshida T, Okada S, Hatano M, Miki T, Ishibashi K, Okabe S, Koseki H, Hirosawa S, Taniguchi M *et al*: Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *The Journal of experimental medicine* 1997, 186(3):439-448.
- Gajewski TF**, Fitch FW: Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *Journal of immunology* 1988, 140(12):4245-4252.
- Garside P**, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK: Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998, 281(5373):96-99.
- Geha RS**, Jabara HH, Brodeur SR: The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature reviews Immunology* 2003, 3(9):721-732.
- Gigoux M**, Shang J, Pak Y, Xu M, Choe J, Mak TW, Suh WK: Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, 106(48):20371-20376.
- Goenka R**, Barnett LG, Silver JS, O'Neill PJ, Hunter CA, Cancro MP, Laufer TM: Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *Journal of immunology* 2011, 187(3):1091-1095.
- Gonzalo JA**, Tian J, Delaney T, Corcoran J, Rottman JB, Lora J, Al-garawi A, Kroczeck R, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ: ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nature immunology* 2001, 2(7):597-604.
- Good-Jacobson KL**, Shlomchik MJ: Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *Journal of immunology* 2010, 185(6):3117-3125.

- Goodnow CC**, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R: Control systems and decision making for antibody production. *Nature immunology* 2010, 11(8):681-688.
- Gordon J**, MacLean LD: A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. *Nature* 1965, 208(5012):795-796.
- Gorham JD**, Guler ML, Steen RG, Mackey AJ, Daly MJ, Frederick K, Dietrich WF, Murphy KM: Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93(22):12467-12472.
- Gray D**, Skarvall H: B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 1988, 336(6194):70-73.
- Grimbacher B**, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, Eibel H, Fischer B, Schaffer AA, Mages HW *et al*: Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature immunology* 2003, 4(3):261-268.
- Grouard G**, Durand I, Figueira L, Banchereau J, Liu YJ: Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 1996, 384(6607):364-367.
- Guo J**, Stolina M, Bready JV, Yin S, Horan T, Yoshinaga SK, Senaldi G: Stimulatory effects of B7-related protein-1 on cellular and humoral immune responses in mice. *Journal of immunology* 2001, 166(9):5578-5584.
- Han S**, Zheng B, Schatz DG, Spanopoulou E, Kelsoe G: Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science* 1996, 274(5295):2094-2097.
- Harada A**, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K: Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of leukocyte biology* 1994, 56(5):559-564.
- Harris MB**, Chang CC, Berton MT, Danial NN, Zhang J, Kuehner D, Ye BH, Kvatyuk M, Pandolfi PP, Cattoretti G *et al*: Transcriptional repression of Stat6-dependent interleukin-4-induced genes by BCL-6: specific regulation of iepsilon transcription and immunoglobulin E switching. *Molecular and cellular biology* 1999, 19(10):7264-7275.
- Harris NL**, Watt V, Ronchese F, Le Gros G: Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *The Journal of experimental medicine* 2002, 195(3):317-326.
- Hart TK**, Blackburn MN, Brigham-Burke M, Dede K, Al-Mahdi N, Zia-Amirhosseini P, Cook RM: Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clinical and experimental immunology* 2002, 130(1):93-100.
- Haynes NM**, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG: Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *Journal of immunology* 2007, 179(8):5099-5108.
- Hegazy AN**, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Frohlich A, Bergthaler A, Flatz L, Pinschewer DD, Radbruch A, Lohning M: Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 2010, 32(1):116-128.
- Hikida M**, Casola S, Takahashi N, Kaji T, Takemori T, Rajewsky K, Kurosaki T: PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *The Journal of experimental medicine* 2009, 206(3):681-689.
- Ho IC**, Tai TS, Pai SY: GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nature reviews Immunology* 2009, 9(2):125-135.



- Holgate ST**, Polosa R: Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature reviews Immunology* 2008, 8(3):218-230.
- Holt PG**, Batty JE, Turner KJ: Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981, 42(3):409-417.
- Hutloff A**, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA: ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999, 397(6716):263-266.
- Hutloff A**, Buchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, Dorner T, Kroczeck RA: Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2004, 50(10):3211-3220.
- Inamine A**, Takahashi Y, Baba N, Miyake K, Tokuhisa T, Takemori T, Abe R: Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *International immunology* 2005, 17(5):581-589.
- Ito T**, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gilliet M, Liu YJ: Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008, 28(6):870-880.
- Jacob J**, Kassir R, Kelsoe G: In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *The Journal of experimental medicine* 1991, 173(5):1165-1175.
- Johnston RJ**, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S: Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 2009, 325(5943):1006-1010.
- Kallinich T**, Beier KC, Gelfand EW, Kroczeck RA, Hamelmann E: Co-stimulatory molecules as potential targets for therapeutic intervention in allergic airway disease. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2005, 35(12):1521-1534.
- Karrer U**, Lopez-Macias C, Oxenius A, Odermatt B, Bachmann MF, Kalinke U, Bluethmann H, Hengartner H, Zinkernagel RM: Antiviral B cell memory in the absence of mature follicular dendritic cell networks and classical germinal centers in TNFR1<sup>-/-</sup> mice. *Journal of immunology* 2000, 164(2):768-778.
- Kato J**, Motoyama N, Taniuchi I, Takeshita H, Toyoda M, Masuda K, Watanabe T: Affinity maturation in Lyn kinase-deficient mice with defective germinal center formation. *Journal of immunology* 1998, 160(10):4788-4795.
- Khayyamian S**, Hutloff A, Buchner K, Grafe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW: ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4<sup>+</sup> T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99(9):6198-6203.
- Kips JC**, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock A, Kerstjens HA, Postma DS, Danzig M, Cuss F, Pauwels RA: Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003, 167(12):1655-1659.
- Kips JC**, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lotvall J, Pauwels RA, Plopper CG et al: Murine models of asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2003, 22(2):374-382.

- Kocks JR**, Davalos-Misslitz AC, Hintzen G, Ohl L, Forster R: Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue. *The Journal of experimental medicine* 2007, 204(4):723-734.
- Kosco MH**, Szakal AK, Tew JG: In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *Journal of immunology* 1988, 140(2):354-360.
- Kroczek RA**, Mages HW, Hutloff A: Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Current opinion in immunology* 2004, 16(3):321-327.
- Kroczek R**, Hamelmann E: T-cell costimulatory molecules: optimal targets for the treatment of allergic airway disease with monoclonal antibodies. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005, 116(4):906-909.
- Kuo TC**, Shaffer AL, Haddad J, Jr., Choi YS, Staudt LM, Calame K: Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *The Journal of experimental medicine* 2007, 204(4):819-830.
- Lafferty KJ**, Cooley MA, Woolnough J, Walker KZ: Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science* 1975, 188(4185):259-261.
- Lamb JR**, Skidmore BJ, Green N, Chiller JM, Feldmann M: Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *The Journal of experimental medicine* 1983, 157(5):1434-1447.
- Laszlo G**, Hathcock KS, Dickler HB, Hodes RJ: Characterization of a novel cell-surface molecule expressed on subpopulations of activated T and B cells. *Journal of immunology* 1993, 150(12):5252-5262.
- Le Gros G**, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE: Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine* 1990, 172(3):921-929.
- Le TV**, Kim TH, Chaplin DD: Intracloonal competition inhibits the formation of high-affinity antibody-secreting cells. *Journal of immunology* 2008, 181(9):6027-6037.
- Leckie MJ**, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R *et al*: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000, 356(9248):2144-2148.
- Lee HJ**, Takemoto N, Kurata H, Kamogawa Y, Miyatake S, O'Garra A, Arai N: GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *The Journal of experimental medicine* 2000, 192(1):105-115.
- Lee SK**, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, Ramiscal RR, Chan TD, Gatto D, Brink R *et al*: B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *The Journal of experimental medicine* 2011, 208(7):1377-1388.
- Lindell DM**, Berlin AA, Schaller MA, Lukacs NW: B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. *PLoS one* 2008, 3(9):e3129.
- Ling V**, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, Fouser LA, Leonard JP, Hunter SE, Zollner R, Thomas JL *et al*: Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *Journal of immunology* 2000, 164(4):1653-1657.

- Ling V**, Wu PW, Miyashiro JS, Marusic S, Finnerty HF, Collins M: Differential expression of inducible costimulator-ligand splice variants: lymphoid regulation of mouse GL50-B and human GL50 molecules. *Journal of immunology* 2001, 166(12):7300-7308.
- Linterman MA**, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG: IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of experimental medicine* 2010, 207(2):353-363.
- Linton PJ**, Bautista B, Biederman E, Bradley ES, Harbertson J, Kondrack RM, Padrick RC, Bradley LM: Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2003, 197(7):875-883.
- Lischke T**, Hegemann A, Gurka S, Vu Van D, Burmeister Y, Lam KP, Kershaw O, Mollenkopf HJ, Mages HW, Hutloff A, Kroczeck RA: Comprehensive Analysis of CD4+ T Cells in the Decision between Tolerance and Immunity In Vivo Reveals a Pivotal Role for ICOS. *Journal of immunology* 2012, 189(1):234-244.
- Lloyd CM**, Gonzalo JA, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC: Mouse models of allergic airway disease. *Advances in immunology* 2001, 77:263-295.
- Lohning M**, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, Kroczeck RA: Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* 2003, 197(2):181-193.
- Lukacs NW**: Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature reviews Immunology* 2001, 1(2):108-116.
- Lund FE**, Randall TD: Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nature reviews Immunology* 2010, 10(4):236-247.
- Lyons AB**, Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 1994, 171(1):131-137.
- MacLennan IC**, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG: Extrafollicular antibody responses. *Immunological reviews* 2003, 194:8-18.
- Macpherson AJ**, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM: A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000, 288(5474):2222-2226.
- Mages HW**, Hutloff A, Heuck C, Buchner K, Himmelbauer H, Oliveri F, Kroczeck RA: Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *European journal of immunology* 2000, 30(4):1040-1047.
- Mahajan S**, Cervera A, MacLeod M, Fillatreau S, Perona-Wright G, Meek S, Smith A, MacDonald A, Gray D: The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells. *European journal of immunology* 2007, 37(7):1796-1808.
- Mak TW**, Shahinian A, Yoshinaga SK, Wakeham A, Boucher LM, Pintilie M, Duncan G, Gajewska BU, Gronski M, Eriksson U *et al*: Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nature immunology* 2003, 4(8):765-772.

- Malynn BA**, Romeo DT, Wortis HH: Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. *Journal of immunology* 1985, 135(2):980-988.
- Maneechotesuwan K**, Xin Y, Ito K, Jazrawi E, Lee KY, Usmani OS, Barnes PJ, Adcock IM: Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *Journal of immunology* 2007, 178(4):2491-2498.
- Mann BS**, Chung KF: Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respiratory research* 2006, 7:59.
- Manz RA**, Thiel A, Radbruch A: Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997, 388(6638):133-134.
- Maruyama M**, Lam KP, Rajewsky K: Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 2000, 407(6804):636-642.
- Matsumoto M**, Lo SF, Carruthers CJ, Min J, Mariathasan S, Huang G, Plas DR, Martin SM, Geha RS, Nahm MH *et al*: Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature* 1996, 382(6590):462-466.
- Mavaddat N**, Mason DW, Atkinson PD, Evans EJ, Gilbert RJ, Stuart DI, Fennelly JA, Barclay AN, Davis SJ, Brown MH: Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *The Journal of biological chemistry* 2000, 275(36):28100-28109.
- McAdam AJ**, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH: ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001, 409(6816):102-105.
- McAdam AJ**, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK *et al*: Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Journal of immunology* 2000, 165(9):5035-5040.
- McCausland MM**, Yusuf I, Tran H, Ono N, Yanagi Y, Crotty S: SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and Fyn kinase. *Journal of immunology* 2007, 178(2):817-828.
- McHeyzer-Williams LJ**, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG: Germinal center reaction. *Current opinion in hematology* 2001, 8(1):52-59.
- McHeyzer-Williams M**, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L: Molecular programming of B cell memory. *Nature reviews Immunology* 2012, 12(1):24-34.
- M'Hidi H**, Thibult ML, Chetaille B, Rey F, Bouadallah R, Nicollas R, Olive D, Xerri L: High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *American journal of clinical pathology* 2009, 132(4):589-596.
- Mikhak Z**, Luster AD: The emergence of basophils as antigen-presenting cells in Th2 inflammatory responses. *Journal of molecular cell biology* 2009, 1(2):69-71.
- Miltenyi S**, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990, 11(2):231-238.

- Minges Wols HA**, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL: The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *Journal of immunology* 2002, 169(8):4213-4221.
- Mosmann TR**, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 1986, 136(7):2348-2357.
- Mosmann TR**, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 1989, 7:145-173.
- Moyron-Quiroz JE**, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, Woodland DL, Lund FE, Randall TD: Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature medicine* 2004, 10(9):927-934.
- Nurieva RI**, Duong J, Kishikawa H, Dianzani U, Rojo JM, Ho I, Flavell RA, Dong C: Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 2003, 18(6):801-811.
- Nurieva RI**, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q et al: Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008, 29(1):138-149.
- Nurieva RI**, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH, Dong C: Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 2009, 325(5943):1001-1005.
- Onizuka T**, Moriyama M, Yamochi T, Kuroda T, Kazama A, Kanazawa N, Sato K, Kato T, Ota H, Mori S: BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 1995, 86(1):28-37.
- Ortega G**, Robb RJ, Shevach EM, Malek TR: The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *Journal of immunology* 1984, 133(4):1970-1975.
- Ouyang W**, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM: Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 1998, 9(5):745-755.
- Ozaki K**, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC, 3rd, Liu C, Schwartzberg PL, Leonard WJ: A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 2002, 298(5598):1630-1634.
- Ozkaynak E**, Gao W, Shemmeri N, Wang C, Gutierrez-Ramos JC, Amaral J, Qin S, Rottman JB, Coyle AJ, Hancock WW: Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nature immunology* 2001, 2(7):591-596.
- Pape KA**, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK: Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 2011, 331(6021):1203-1207.
- Parry RV**, Rumbley CA, Vandenberghe LH, June CH, Riley JL: CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *Journal of immunology* 2003, 171(1):166-174.

- Paus D**, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R: Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *The Journal of experimental medicine* 2006, 203(4):1081-1091.
- Phan TG**, Paus D, Chan TD, Turner ML, Nutt SL, Basten A, Brink R: High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *The Journal of experimental medicine* 2006, 203(11):2419-2424.
- Prat M**, Gribaudo G, Comoglio PM, Cavallo G, Landolfo S: Monoclonal antibodies against murine gamma interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984, 81(14):4515-4519.
- Qi H**, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN: SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 2008, 455(7214):764-769.
- Radbruch A**, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, Hiepe F: Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews Immunology* 2006, 6(10):741-750.
- Randall TD**: Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Advances in immunology* 2010, 107:187-241.
- Reinhardt RL**, Liang HE, Locksley RM: Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nature immunology* 2009, 10(4):385-393.
- Reljic R**, Wagner SD, Peakman LJ, Fearon DT: Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *The Journal of experimental medicine* 2000, 192(12):1841-1848.
- Reth M**, Imanishi-Kari T, Rajewsky K: Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in C 57 BL/6 mice by cell fusion. II. Characterization of idiotopes by monoclonal anti-idiotope antibodies. *European journal of immunology* 1979, 9(12):1004-1013.
- Ridderstad A**, Tarlinton DM: Kinetics of establishing the memory B cell population as revealed by CD38 expression. *Journal of immunology* 1998, 160(10):4688-4695.
- Rivera A**, Chen CC, Ron N, Dougherty JP, Ron Y: Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *International immunology* 2001, 13(12):1583-1593.
- Rodriguez D**, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, Vargaftig BB, Russo M: Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *Journal of immunology* 2003, 171(2):1001-1008.
- Rose CE, Jr.**, Lannigan JA, Kim P, Lee JJ, Fu SM, Sung SS: Murine lung eosinophil activation and chemokine production in allergic airway inflammation. *Cellular & molecular immunology* 2010, 7(5):361-374.
- Rottman JB**, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, Pierce B, Gutierrez-Ramos JC, Ozkaynak E, Coyle AJ: The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature immunology* 2001, 2(7):605-611.

- Roy MP**, Kim CH, Butcher EC: Cytokine control of memory B cell homing machinery. *Journal of immunology* 2002, 169(4):1676-1682.
- Sallusto F**, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* 1995, 182(2):389-400
- Sallusto F**, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *European journal of immunology* 1999, 29(6):2037-2045.
- Sander B**, Hoiden I, Andersson U, Moller E, Abrams JS: Similar frequencies and kinetics of cytokine producing cells in murine peripheral blood and spleen. Cytokine detection by immunoassay and intracellular immunostaining. *Journal of immunological methods* 1993, 166(2):201-214.
- Sanderson RD**, Lalor P, Bernfield M: B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell regulation* 1989, 1(1):27-35.
- Schaerli P**, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B: CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine* 2000, 192(11):1553-1562.
- Seder RA**, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE: Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90(21):10188-10192.
- Seth S**, Ravens I, Kremmer E, Maier MK, Hadis U, Hardtke S, Forster R, Bernhardt G: Abundance of follicular helper T cells in Peyer's patches is modulated by CD155. *European journal of immunology* 2009, 39(11):3160-3170.
- Shaffer AL**, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM: BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000, 13(2):199-212.
- Shaffer AL**, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltneane JM, Yang L, Zhao H, Calame K *et al*: Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002, 17(1):51-62.
- Shahinian A**, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW: Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993, 261(5121):609-612.
- Sharpe AH**, Freeman GJ: The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews Immunology* 2002, 2(2):116-126.
- Shaw DE**, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID: Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest* 2007, 132(6):1871-1875.
- Shi HZ**: Eosinophils function as antigen-presenting cells. *Journal of leukocyte biology* 2004, 76(3):520-527.
- Shih TA**, Meffre E, Roederer M, Nussenzweig MC: Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nature immunology* 2002, 3(6):570-575.

- Siepmann K**, Skok J, van Essen D, Harnett M, Gray D: Rewiring of CD40 is necessary for delivery of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. *Immunology* 2001, 102(3):263-272.
- Skapenko A**, Leipe J, Niesner U, Devriendt K, Beetz R, Radbruch A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H: GATA-3 in human T cell helper type 2 development. *The Journal of experimental medicine* 2004, 199(3):423-428.
- Slifka MK**, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R: Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 1998, 8(3):363-372.
- Smith KG**, Nossal GJ, Tarlinton DM: FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, 92(25):11628-11632.
- Smith KG**, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM: The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *The EMBO journal* 1997, 16(11):2996-3006.
- Smith KM**, Brewer JM, Webb P, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos C, Garside P: Inducible costimulatory molecule-B7-related protein 1 interactions are important for the clonal expansion and B cell helper functions of naive, Th1, and Th2 T cells. *Journal of immunology* 2003, 170(5):2310-2315.
- Snapper CM**, Paul WE: Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987, 236(4804):944-947.
- Snow EC**, Noelle RJ, Uhr JW, Vitetta ES: Activation of antigen-enriched B cells. II. Role of linked recognition in B cell proliferation to thymus-dependent antigens. *Journal of immunology* 1983, 130(2):614-618.
- Sonoda E**, Matsumoto R, Hitoshi Y, Ishii T, Sugimoto M, Araki S, Tominaga A, Yamaguchi N, Takatsu K: Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *The Journal of experimental medicine* 1989, 170(4):1415-1420.
- Sonoda E**, Pewzner-Jung Y, Schwers S, Taki S, Jung S, Eilat D, Rajewsky K: B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity* 1997, 6(3):225-233.
- Stephens R**, Chaplin DD: IgE cross-linking or lipopolysaccharide treatment induces recruitment of Th2 cells to the lung in the absence of specific antigen. *Journal of immunology* 2002, 169(10):5468-5476.
- Stevens WW**, Kim TS, Pujanauski LM, Hao X, Braciale TJ: Detection and quantitation of eosinophils in the murine respiratory tract by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 2007, 327(1-2):63-74.
- Sugai M**, Gonda H, Kusunoki T, Katakai T, Yokota Y, Shimizu A: Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nature immunology* 2003, 4(1):25-30.
- Suto A**, Kashiwakuma D, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, Saito Y, Nakayama T, Grusby MJ, Iwamoto I et al: Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 2008, 205(6):1369-1379.
- Swain SL**, Weinberg AD, English M, Huston G: IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology* 1990, 145(11):3796-3806.



- Swallow MM**, Wallin JJ, Sha WC: B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 1999, 11(4):423-432.
- Szabo SJ**, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000, 100(6):655-669.
- Sze DM**, Toellner KM, Garcia de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC: Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *The Journal of experimental medicine* 2000, 192(6):813-821.
- Tafari A**, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VS, Duncan G *et al*: ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001, 409(6816):105-109.
- Takahashi Y**, Cerasoli DM, Dal Porto JM, Shimoda M, Freund R, Fang W, Telander DG, Malvey EN, Mueller DL, Behrens TW *et al*: Relaxed negative selection in germinal centers and impaired affinity maturation in bcl-xL transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* 1999, 190(3):399-410.
- Tangye SG**, Good KL: Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *Journal of immunology* 2007, 179(1):13-19.
- Toellner KM**, Luther SA, Sze DM, Choy RK, Taylor DR, MacLennan IC, Acha-Orbea H: T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *The Journal of experimental medicine* 1998, 187(8):1193-1204.
- Tomonari K**, Lovering E: T-cell receptor-specific monoclonal antibodies against a V beta 11-positive mouse T-cell clone. *Immunogenetics* 1988, 28(6):445-451.
- Townsend SE**, Goodnow CC: Abortive proliferation of rare T cells induced by direct or indirect antigen presentation by rare B cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1998, 187(10):1611-1621.
- Toyama H**, Okada S, Hatano M, Takahashi Y, Takeda N, Ichii H, Takemori T, Kuroda Y, Tokuhisa T: Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 2002, 17(3):329-339.
- Turner CA, Jr.**, Mack DH, Davis MM: Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994, 77(2):297-306.
- Van den Broeck W**, Derore A, Simoens P: Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *Journal of immunological methods* 2006, 312(1-2):12-19.
- van Rijt LS**, Kuipers H, Vos N, Hijdra D, Hoogsteden HC, Lambrecht BN: A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *Journal of immunological methods* 2004, 288(1-2):111-121.
- Velasco G**, Campo M, Manrique OJ, Bellou A, He H, Arestides RS, Schaub B, Perkins DL, Finn PW: Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2005, 32(3):218-224.
- Victora GD**, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, Nussenzweig MC: Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010, 143(4):592-605.
- Vikstrom I**, Carotta S, Luthje K, Peperzak V, Jost PJ, Glaser S, Busslinger M, Bouillet P, Strasser A, Nutt SL *et al*: Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science* 2010, 330(6007):1095-1099.

- Vinuesa CG**, Cook MC, Angelucci C, Athanopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D, Domasch H, Whittle B, Lambe T *et al*: A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 2005, 435(7041):452-458.
- Wan GH**, Li CS, Lin RH: Airborne endotoxin exposure and the development of airway antigen-specific allergic responses. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2000, 30(3):426-432.
- Wang S**, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, Ni J, Chen L: Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 2000, 96(8):2808-2813.
- Wang N**, Satoskar A, Faubion W, Howie D, Okamoto S, Feske S, Gullo C, Clarke K, Sosa MR, Sharpe AH *et al*: The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *The Journal of experimental medicine* 2004, 199(9):1255-1264.
- Warnock RA**, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH: Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 1998, 187(2):205-216.
- Watanabe J**, Miyazaki Y, Zimmerman GA, Albertine KH, McIntyre TM: Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. *The Journal of biological chemistry* 2003, 278(43):42361-42368.
- Watts TH**: TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology* 2005, 23:23-68.
- Weigert MG**, Cesari IM, Yonkovich SJ, Cohn M: Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 1970, 228(5276):1045-1047.
- Witko-Sarsat V**, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L: Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2000, 80(5):617-653.
- Wong SC**, Oh E, Ng CH, Lam KP: Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7-H2. *Blood* 2003, 102(4):1381-1388.
- Woodfolk JA**: T-cell responses to allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007, 119(2):280-294; quiz 295-286.
- Wright SD**, Ramos RA, Hermanowski-Vosatka A, Rockwell P, Detmers PA: Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *The Journal of experimental medicine* 1991, 173(5):1281-1286.
- Xiong H**, Dolpady J, Wabl M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ: Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *The Journal of experimental medicine* 2012, 209(2):353-364.
- Xu L**, Rothman P: IFN-gamma represses epsilon germline transcription and subsequently down-regulates switch recombination to epsilon. *International immunology* 1994, 6(4):515-521.
- Yamaguchi Y**, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, Tominaga A, Takatsu K: Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *The Journal of experimental medicine* 1988, 167(1):43-56.

- Ye BH**, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RS et al: The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nature genetics* 1997, 16(2):161-170.
- Yong PF**, Salzer U, Grimbacher B: The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunological reviews* 2009, 229(1):101-113.
- Yoshinaga SK**, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T et al: T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999, 402(6763):827-832.
- Yu D**, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N et al: The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 2009, 31(3):457-468.
- Yusuf I**, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Ditoro D, Hansen K, Barnett B, Crotty S: Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *Journal of immunology* 2010, 185(1):190-202.
- Zhang DH**, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A: Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *The Journal of biological chemistry* 1997, 272(34):21597-21603.
- Zhang DH**, Yang L, Ray A: Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *Journal of immunology* 1998, 161(8):3817-3821.
- Zhang TT**, Makondo KJ, Marshall AJ: p110delta phosphoinositide 3-kinase represses IgE switch by potentiating BCL6 expression. *Journal of immunology* 2012, 188(8):3700-3708.
- Zheng W**, Flavell RA: The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997, 89(4):587-596.
- Zosky GR, Sly PD**: Animal models of asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2007, 37(7):973-988.
- Zotos D**, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, Corcoran LM, Godfrey DI, Toellner KM, Smyth MJ et al: IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *The Journal of experimental medicine* 2010, 207(2):365-378.
- Zou YR**, Takeda S, Rajewsky K: Gene targeting in the Ig kappa locus: efficient generation of lambda chain-expressing B cells, independent of gene rearrangements in Ig kappa. *The EMBO journal* 1993, 12(3):811-820.

## Zusammenfassung

ICOS ist ein Zelloberflächenmolekül, das aktivierungsabhängig von T-Zellen exprimiert wird. ICOS-Ligand weist dagegen ein breiteres Expressionsmuster auf und wird konstitutiv auf Dendritischen Zellen (DZ) und B-Zellen exprimiert und kann aktivierungsinduziert sogar von nicht-lymphoiden Zellen exprimiert werden. Durch die breite Expression des Liganden ergeben sich vielfältige Interaktionsmöglichkeiten für ICOS exprimierende T-Zellen. Bisher wurde aber nur von wenigen Gruppen der Versuch unternommen, die Relevanz der ICOS-Signalgebung zwischen T-Zellen und DZ von der zwischen T-Zellen und B-Zellen abzugrenzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges, murines Atemwegsinfektionsmodell etabliert, das es erlaubt, antigenspezifische T- und B-Zellen *in vivo* zu verfolgen. Darüber hinaus ermöglichte es, die Relevanz der ICOS-Signalgebung in der T-B- sowie T-DZ-Interaktion isoliert zu betrachten. Durch die Analyse von Zellen aus der Lunge und dem Lungen-drainierenden Lymphknoten war es möglich, immunologische Prozesse in lymphoiden und peripheren (nicht-lymphoiden) Strukturen parallel zu verfolgen. In dieser Arbeit konnte erstmalig klar gezeigt werden, dass die Interaktion von ICOS mit seinem Liganden in der T-DZ-Kooperation besonders in der frühen Phase der Immunantwort eine Rolle spielt. Die Generierung von Follikulären T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) und Keimzentrums-B-Zellen (KZB) war massiv gestört, wenn die Signalgebung über ICOS in der initialen T-DZ-Interaktion fehlte. Der verursachte Defekt war dabei quantitativer und nicht qualitativer Natur, da sich die wenigen  $T_{FH}$ - und KZB-Zellen phänotypisch nicht von denen im Wildtyp (WT) unterschieden.

Die Interaktion von ICOS mit seinem Liganden in der T-B-Kooperation spielte in der späten Phase der Immunantwort eine Rolle. Fehlte die Kostimulation über ICOS zwischen antigenspezifischen T- und B-Zellen, war einerseits die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen beeinträchtigt, andererseits konnten  $T_H2$ -Effektorfunktionen im entzündeten Gewebe nicht effizient aufrechterhalten werden. Die Frequenz an IL-5 und IL-13 produzierenden T-Effektorzellen war reduziert, wodurch weniger Eosinophile ins Lungengewebe einströmten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass B-Gedächtniszellen, nicht aber Plasmazellen von einer Kostimulation über ICOS abhängig sind, wobei Dendritische Zellen und B-Zellen als ICOS-L tragende Zellen einen gemeinsamen, positiven Beitrag dazu leisteten.

Die vorliegende Arbeit trägt somit zu einem besseren Verständnis der komplexen Interaktionsmöglichkeiten bei, die eine ICOS-positive T-Zelle im Verlauf einer Immunantwort besitzt und zeigt, dass B-Zellen eine wichtige Rolle als antigenpräsentierende Zellen für die lokale Immunantwort im peripheren, entzündeten Gewebe spielen.

## Summary

ICOS is a cell surface molecule that is expressed by T cells upon activation. In contrast to ICOS, ICOS-L is constitutively expressed on a variety of different cell types including dendritic cells and B cells. After activation ICOS-L can also be expressed by endothelial cells. Due to the broad expression pattern of ICOS-L ICOS-expressing T cells have diverse opportunities to interact with different cell types. However, only few groups tried to differentiate the relevance of ICOS costimulation for the interaction of antigen-specific T cells with dendritic cells from that of antigen-specific T cells with B cells.

We established a novel murine airway inflammation model which allowed tracking of antigen-specific T and B cells *in vivo*. Furthermore it was possible to discriminate the role of ICOS costimulation in the interaction of T cells with dendritic cells from that of T and B cells. The analysis of cells from lung and lung-draining lymph node made it possible to follow up immunological processes in lymphoid and non-lymphoid organs. Using this system we could show that ICOS costimulation between T cells and dendritic cells is most important during the initiation of an immune response. The generation of T follicular helper (T<sub>FH</sub>) cells and germinal center (GC) B cells was strongly impaired when ICOS-L was missing in the initial T-DC-interaction. It was a quantitative and not qualitative effect because the small number of developing T<sub>FH</sub> cells and GC B cells exhibited a normal phenotype.

ICOS-signaling between T and B cells is of great importance for late phases of the immune response. The absence of ICOS-costimulation during the activation of antigen-specific B cells had an impact on the antigen-presenting capacity of these cells. Furthermore the maintenance of T<sub>H</sub>2 effector functions was disturbed in the inflamed tissue. As a result the frequency of IL-5 and IL-13 producing antigen-specific T cells was reduced and smaller numbers of lung-infiltrating eosinophils were observed.

In addition, the differentiation of memory B cells but not antibody-producing plasma cells was dependent on ICOS costimulation. Both B cells and dendritic cells as ICOS-L bearing cells were required in this step

In summary this work helps to understand the complex interaction opportunities of an ICOS-expressing T cell during an immune response. Furthermore it shows a role for B cells as antigen-presenting cells during the local immune response in peripheral inflamed tissues.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Publikationen und Kongressbeiträge

### *Publikationen*

Lischke T, Hegemann A, Gurka S, **Vu Van D**, Burmeister Y, Lam KP, Kershaw O, Mollenkopf HJ, Mages HW, Hutloff A, Kroczeck RA: Comprehensive Analysis of CD4+ T Cells in the Decision between Tolerance and Immunity In Vivo Reveals a Pivotal Role for ICOS. *J Immunol.* 2012, 189 (1): 234-244.

Oefner CM, Winkler A, Hess C, Lorenz AK, Holecska V, Huxdorf M, Schommartz T, Petzold D, Bitterling J, Schoen AL, Stoehr AD, **Vu Van D**, Darcan-Nikolaisen Y, Blanchard V, Schmutde I, Laumonier Y, Ströver HA, Hegazy AN, Eiglmeier S, Schoen CT, Mertes MM, Loddenkemper C, Löhning M, König P, Petersen A, Luger EO, Collin M, Köhl J, Hutloff A, Hamelmann E, Berger M, Wardemann H, Ehlers M.: Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *J Allergy Clin Immunol.* 2012, 129 (6): 1647-1655.

Gerhold K, Avagyan A, Reichert E, Seib C, **Vu Van D**, Luger EO, Hutloff A, Hamelmann E.: Prenatal allergen exposures prevent allergen-induced sensitization and airway inflammation in young mice. *Allergy* 2012, 67 (3): 353-361.

**Vu Van D**, Beier KC, Franke RK, Kroczeck RA, Hutloff A.: ICOS plays an important role for local interaction of antigen-specific T and B cells in inflamed lung tissue. Manuskript in Vorbereitung

### *Kongressbeiträge*

**Vu Van D**, Franke RK, Al-Baz MS, Kroczeck RA, Hamelmann E, Beier KC, Hutloff A. Local interaction of antigen-specific T and B cells in chronically inflamed lung tissue (Vortrag). 3rd European Congress of Immunology, 5-7 September 2012, Glasgow

**Vu Van D**, Franke RK, Beier KC, Hutloff A. The role of the inducible costimulator ICOS for local T/B cell cooperation in a murine model of allergic airway inflammation (Poster). 10th B Cell Forum, 5-7 März 2012, Kloster Banz, Bad Staffelstein, Bayern

**Vu Van D**, Franke RK, Beier KC, Hutloff A. The role of ICOS for local T/B interaction in an airway inflammation model (Vortrag). Joint Annual Meeting SIICA-Dgfi, 28. September-1. Oktober 2011, Riccione, Italien

**Vu Van D**, Franke RK, Burmeister Y, Kroczeck RA, Beier KC, Hutloff A. A novel mouse airway inflammation model to study interactions of allergen-specific T and B cells (Poster). 2nd European Congress of Immunology, 13-16 September 2009, Berlin

## Danksagung

Mein erster Dank geht an Dr. Andreas Hutloff für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die gute Betreuung und dafür, dass er mir die Zeit gegeben hat, diese Arbeit in Ruhe fertigzustellen.

Darüber hinaus danke ich auch Dr. Katja Beier, die trotz der knappen Zeit, die ihr zur Verfügung stand, immer für ein Gespräch bereit war.

Prof. Dr. Richard A. Kroczek danke ich dafür, dass ich alle Ressourcen der Arbeitsgruppe P21 uneingeschränkt nutzen durfte.

Ein großer Dank geht auch an Prof. Dr. Rupert Mutzel für seine Bereitschaft, die Gutachterschaft für diese Arbeit zu übernehmen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe P21 danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen Momente. Mein besonderer Dank geht an unsere kleinen Heinzelfrauchen Katja Ranke, Ewa Schlereth, Petra Jahn und Monika Jaensch, ohne die der Laboralltag so viel schwerer gewesen wäre.

Natürlich möchte ich nicht vergessen, den Tierpflegern zu danken.

Ein ganz besonderer und großer Dank geht an meine Familie, ohne die ich nicht der Mensch geworden wäre, der ich bin. Ich danke euch für euren Trost und euer Verständnis sowie die Geduld, die ihr mit mir hattet, wenn die Frustrationsgrenze mal wieder überschritten war.

Meinem Freund Andreas danke ich ebenso von ganzem Herzen für sein Verständnis, seine Geduld und dafür, dass er mir den Rücken frei gehalten hat.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Gemäß § 7 Abs. 4 der Promotionsverordnung vom 04.09.2007 des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin:

Hiermit versichere ich, Dana Vu Van, geboren am 14.10.1983 in Hoyerswerda, an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Die Rolle des induzierbaren Kostimulators ICOS in der Kooperation von T- und B-Zellen im entzündeten Gewebe“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens gewesen ist.

Berlin, 31.07.2012

Dana Vu Van