III Ergebnisse

III.1 Expressionsanalyse des ICOS-L auf Subpopulationen von murinen Dendritischen Zellen (DZ)

Im Menschen und in der Maus gibt es verschiedene DZ-Subtypen. Die Expression des ICOS-L wurde bereits auf humanen, aus Monozyten generierten DZ (Aicher *et al.*, 2000: Wang *et al.*, 2000) und auf Langerhans-Zellen *in situ* gezeigt (Witsch *et al.*, 2002). Im murinen System wurde ICOS-L in einem Modell ovalbumininduzierter Atemwegsentzündung auf DZ aus peribronchialen Lymphknoten (Akbari *et al.*, 2002) und auf *ex vivo* isolierten Milz-DZ (Ling *et al.*, 2001) nachgewiesen. Die Funktion, Regulation und Expression des ICOS-L auf primären DZ der Maus ist nur rudimentär bekannt und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

DZ in der Milz von Mäusen lassen sich anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und ihrer Funktion (Übersichtsartikel: Shortman et al., 2002) in drei große Subpopulationen aufteilen: CD11c^{hi} (hi = "high expression"), CD8αα⁺-DZ (CD8⁺-DZ, ca. 20 % der CD11c^{hi} Population); CD11c^{hi} CD8αα⁻-DZ (CD8⁻-DZ, ca. 80 % der CD11c^{hi} Population) und CD11c^{lo} (lo = "low expression"), CD45RA⁺-plasmazytoide DZ (pDZ). Durch die unterschiedliche Expression weiterer Oberflächenmoleküle wie CD11b, CD205 und CD4 lassen sich diese Populationen phänotypisch noch weiter unterteilen, die funktionellen Unterschiede auf diesen Ebenen sind jedoch nicht geklärt. PDZ zeichnen sich durch die starke Produktion von Typ I Interferonen nach Stimulation durch Bakterien, Parasiten und Viren aus (Übersicht: Liu et al., 2005). CD8⁺-und CD8⁻ -DZ unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zur Phagozytose, zur Präsentation von exogenen Antigenen im Kontext mit MHC-I-Molekülen und in der TH1/TH2 Ausrichtung einer Zytokinantwort aktivierter T-Zellen (Übersichtsartikel: Maldonado-Lopez et al., 2001). Daher wurde die Expression des ICOS-L auf Subtypen von Milz-DZ analysiert.

III.1.1 Etablierung einer Methode zum Anreichern von murinen DZ aus sekundärem lymphatischen Gewebe

Für die Analyse der ICOS-L-Expression auf murinen DZ wurde eine Methode zur Aufreinigung der DZ aus sekundärem lymphatischen Gewebe im Labor etabliert (Shortman et al., 1968, Mc Lellan et al., 2002). Milzen oder Lymphknoten werden nach Entnahme aus dem Gewebe zunächst zerkleinert, mit DNAse und Kollagenase verdaut und Zell-Zell Kontakte werden durch EDTA-Zugabe unterbrochen. Das Gewebe wird durch Siebe gedrückt und man erhält eine Suspension einzelner Zellen. Diese wird dann über ein Glucosepolymer (Nycodenz) mit einer Dichte von 1.096 g/cm³ geschichtet und zentrifugiert. Dabei pelletieren alle Partikel und Zellen mit einer Dichte größer als 1,096 g/cm³. DZ und Lymphozyten reichern sich an der Interphase an und können dort entnommen werden. Dadurch werden CD11c⁺-DZ zu einem Anteil von ca. 20 bis 30% angereichert (Abb.1). Durch magnetische Zellsortierung (MACS) wurden die Zellen ggf. weiter aufgereinigt. Die MACS-Technik ermöglicht es, Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker zu sortieren. Dafür wurden heterogene Zellpopulationen mit an superparamagnetische Partikel (beads, Durchmesser ca. 100 nm) gekoppelten Antikörpern inkubiert und die Zellen, die Antikörper gebunden haben, mit einem starken Magneten heraussortiert (Miltenyi et al., 1990). So konnten CD11c⁺-DZ mit einer Reinheit von über 95 % gewonnen werden (Abb. 1).



Abb. 2: Aufreinigung muriner DZ aus der Milz. MHC-II/CD11c-Expression von primären murinen Milz-Zellen nach verschiedenen Aufreinigungsschritten. Murine CD11c/MHC-II positive DZ wurden aus der Milz durch Dichte-gradientenzentrifugation sowie magnetischer Zellsortierung (MACS) aufgereinigt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens 5.

III.1.2 Murine DZ regulieren ICOS-L nach Aktivierung *in vitro* auf der Zelloberfläche herauf

DZ aus der Milz wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und für 20 h in vitro kultiviert. Danach wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die verschiedenen DZ-Subpopulationen wurden anhand spezifischer, fluorochrom-gekoppelter monoklonaler Antikörper angefärbt. CD8⁺ und CD8⁻ DZ wurden anhand ihrer CD11c^{hi} und CD8-Expression identifiziert. PDZ wurden indirekt anhand ihrer CD11c^{lo}-Expression ausgewählt. Die Expression von ICOS-L auf den verschiedenen Subpopulationen wurde vergleichend mit der Expression von CD80, CD86, PD-L1 und PD-L2 zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 2). Zur Färbung des ICOS-L wurde Phycoerythrin (PE) gekoppeltes, laboreigenes Fusionsprotein ein an verwendet. Es besteht aus murinem ICOS, das an einen humanen IgG-Fc-Teil fusioniert ist (mulCOS-hulgG, Mages et al., 2000). Als Maß für die Expressionstärke der Moleküle auf der Zelloberfläche diente bei der durchflusszytometrischen Analyse der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Färbereagenzien (geo. M.).

Generell wurden alle Oberflächenmoleküle auf den CD8⁺ und CD8⁻ DZ stärker exprimiert als auf den pDZ. Eine basale Expression des ICOS-L war auf keiner der DZ-Subpopulationen detektierbar. Spätere Analysen mit ICOS-L spezifischen monoklonalen Antikörpern (HK5.3, MIL666 und MIL957) zeigten jedoch auch auf unstimulierten, frisch isolierten DZ eine schwache basale Expression von ICOS-L (Daten nicht gezeigt). Für PD-L2 ist keine basale Expression detektierbar, CD80, CD86 und PD-L1 wurden demgegenüber jedoch basal auf allen Subtypen exprimiert.

In der Zellkultur kommt es zu einer Aktivierung aller DZ Subtypen, in deren Verlauf die untersuchten Oberflächenmoleküle deutlich heraufreguliert wurden. Die ICOS-L-Expression von CD8⁻ und CD8⁺ DZ stieg nach 20 h von einem geometrischen Mittelwert (geo. M.) von 5 bzw. 2 auf einen geo. M. von 58 bzw. 47 an. Auf pDC wurde das Molekül mit einem geo. M. von 17 nach 20 h deutlich weniger stark exprimiert. Damit verhält sich ICOS-L ähnlich wie CD80, CD86 und PD-L1. Die Expression von PD-L2 unterscheidet sich davon: Das Molekül wird zwar ebenfalls auf den pDC am schwächsten exprimiert, zeigt zudem aber

auch einen Unterschied in der Expressionstärke zwischen CD8⁺- und CD8⁻-DZ. Mit einem geo. M. von 136 auf CD8⁺ DZ nach 8 h wird das Molekül auf CD8⁺ DZ deutlich stärker exprimiert als auf CD8⁻ DZ (geo. M. = 8 nach 8h Kultur). Außerdem besitzt PD-L2 auf den CD8⁺ DZ bei 8 h ein Maximum der Expression (geo. M. 8 h = 136, 12 h = 51). Alle anderen Moleküle werden um so stärker exprimiert, je länger sie in Kultur gehalten werden. Da über Nacht ca. 50 % der eingesetzten Zellen starben (nicht gezeigt), wurde die Kinetik auf 20 h begrenzt. Experimente, in denen die Population der pDZ anhand ihrer Expression von CD11c und CD45RA dargestellt wurden, zeigten ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).







Abb. 3: Zeitkinetik der Expression von ICOS-L und anderen B7-Liganden auf der Zelloberfläche von DZ- Subpopulationen aus der Milz in vitro. Die Zellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert (30% CD11c+-DZ, vgl. Abb.1) und in vitro kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression der angezeigten Öberflächenmoleküle auf den ausgewählten DZ-Subpopulationen im Durchflusszytometer untersucht. A: CD8- DZ B: CD8+-DZ C: CD11clo-DZ ("pDZ"). Als Kontrollfärbung diente eine Isotypenkontrolle der verwendeten Antikörper bzw. eine "Kalte Blockade" für die ICOS-L Färbung (gestrichelte, offene Histogramme). Der geometrische Mittelwert der Expressionsintensität der Oberflächenmarker auf den Zellen ist in schwarzen Zahlen angezeigt. Die Kinetik wurde durch mindestens 3 ähnliche Experimente bestätigt.

III.2 Das ICOS/ICOS-L System beeinflusst bei der T-Zell Aktivierung durch DZ die Differenzierung der T-Zellen

Die Analyse der Funktion des ICOS-L auf APZ ist Gegenstand aktueller Forschung. Ein wichtiger Aspekt davon ist der Einfluss des Moleküls auf die Differenzierung von T-Zellen nach Aktivierung durch die Bindung an seinen Rezeptor ICOS. Mc. Adam *et al.* haben gezeigt, dass die Interaktion von ICOS-L auf Milzzellen mit ICOS auf antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen i*n vitro* zu einem TH2-gerichteten Zytokinprofil führt (Mc. Adam *et al.*, 2000).

DZ sind in einem Gemisch aus APZ der Milz nur zu einem geringen Anteil vorhanden (2-3 % aller Milzzellen). Daher ist der Einfluss des ICOS/ICOS-L-Systems auf die Differenzierung der T-Zellen bei der Aktivierung durch DZ alleine unbekannt. DZ sind die einzigen bekannten Zellen, die naive antigenspezifische T-Zellen aktivieren können und dadurch eine Immunantwort initiieren.

Daher wurde ein *in vitro* System zur Funktionsanalyse des Moleküls auf DZ bei der Initiierung einer antigenspezifischen Immunantwort aufgebaut. Antigenbeladene DZ wurden dabei mit antigenspezifischen TZ kokultiviert. Durch die Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion während der Kokultur und die Analyse der produzierten Zytokine wurde der Einfluss der ICOS/ICOS-L vermittelten Kostimulation auf die T-Zell Differenzierung untersucht.

III.2.1 Aufbau eines *in vitro* Kokultursystems für die Analyse der Rolle des ICOS/ICOS-L-Systems bei einer antigenspezifischen Immunantwort

BALB/c DO11.10-Mäuse exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor (TZR) mit Spezifität für Ova-Peptid (Aminosäuren 323-339), das im Kontext mit MHC-II präsentiert wird. Die antigenspezifischen T-Zellen wurden durch MACS isoliert (Reinheit: 95 %, vgl. Abb. 4). CD11c⁺ DZ aus BALB/c-Mäusen wurden ebenfalls aufgereinigt (Abb. 1) und mit Ova-Peptid beladen. (Für die Reinheit der CD11c⁺- DZ vgl. Abb.1)



Abb. 4: Aufreinigung von Ova-Antigen spezifischen T-Zellen: CD4+-T-Zellen aus BALB/c DO11.10-Mäusen wurden durch MACS aufgereinigt (Reinheit: 95%). Der rekombinante T-Zell

III Ergebnisse

Rezeptor besitzt Spezifität für Ova-Peptid im Kontext von MHC-II. Er wurde durch den monoklonalen Antikörper KJ1-26.1 nachgewiesen.

Die TZ wurden anschließend zusammen mit den DZ und Peptid *in vitro* kokultiviert. Die Zytokinkonzentration im Überstand der Kokulturen wurde entweder unmittelbar nach initialer Aktivierung (primäre Stimulation) durch die T-Zellen am Tag 2 (vgl. Abb. 5, Ansatz A) oder nach einer Expansionsphase (Tag 2-5) und darauf folgender Restimulation für 24 h (Tag 5-6, vgl. Abb. 5, Ansatz B) analysiert. Vor der Restimulation wurden die T-Zellen mehrmals gewaschen. Während der Expansionsphase wurde ggf. frisches Medium zugegeben, da die TZ in einigen Ansätzen stark proliferierten. Die initiale Aktivierung der T-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Reagenzien durchgeführt, die die Interaktion von ICOS-L und anderen B7-Liganden auf DZ mit ko-stimulatorischen Molekülen auf den T-Zellen unterbrechen (jeweils 40 μ g/ml, Abb. 5 und Tab. 12)





Abb. 5: Überblick der Kokultur-Ansätze. T-Zellen mit einem transgenen T-Zell Rezeptor, der Spezifität für Ova-Peptid im Kontext von MHC-II besitzt, wurden aus Milzen von BALB/c DO11.10-Mäusen isoliert und mit CD11c+ DZ aus der Milz und Ova-Peptid kokultiviert. Die ICOS/ICOS-L-Interaktion wurde in verschiedenen Phasen der Kokultur durch ein ICOS-Fusionsprotein blockiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zytokine im Kulturüberstand analysiert (Sternchen). A: Analyse der Zytokine nach Blockade während der primären Stimulation. B: Analyse der Zytokine nach Restimulation von TZ, die vorher unter Blockade des ICOS/ICOS-L-Systems primär aktiviert worden sind.

Für die Blockade des ICOS/ICOS-L-Signalwegs wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus murinem ICOS und einem humanen IgG Fc-Teil, verwendet ("muICOS-hulgG", Mages *et al.*, 2000). Zur Blockade der Interaktion von CD80 und CD86 mit CD28 und CTLA-4 wurde ein Fusionsprotein mit Kreuzreaktivität

für murines CD80 und CD86 verwendet. Es besteht aus humanem CTLA-4 und einem humanen IgG Fc-Teil ("huCTLA-4-hulgG1", ATCC). Die Interaktion des MHC-II-Antigen-Komplexes mit dem T-Zell-Rezeptor wurde durch einen blockierenden Antikörper mit Spezifität für murines MHC-II unterbrochen (Klon M5/114.15.2, Bhattacharya *et al.*, 1981). Als Kontrollen dienten eine Mediumkontrolle oder eine Isotypkontrolle (1D10, laboreigener Antikörper).

Reagenz	Quelle/Referenz
mulCOS-hulgG	Mages <i>et al.</i> , 2000
huCTLA-4-hulgG1	ATCC #CRL10762
anti-MHC-II-mAk (M5/114.15.2)	Bhattacharya <i>et al.</i> , 1981
Isotypenkontrolle (1D10)	Eigener Antikörper

Tab. 12: Übersicht der in den Kokulturen verwendeten Blockadereagenzien und Kontrollen. Der ICOS/ICOS-L-Signalweg wurde während der Kokultur durch Zugabe des Fusionsproteins muICOShu-IgG blockiert. Die Interaktion von CD80 und CD86 mit CD28 durch die Zugabe des Fusionsproteins huCTLA-4hulgG blockiert. Die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-II/Peptid-komplex wurde durch Zugabe eines blockierenden, MHC-II-spezifischen monoklonalen Antikörpers (M5/114.15.2) blockiert. Der laboreigene Antikörper 1D10 diente als Isotypenkontrolle.

III.2.2 Analyse der optimalen Peptidkonzentration und Zellverhältnisse für die Kokultur von antigenspezifischen TZ mit DZ

Zunächst mussten Bedingungen gefunden werden, bei denen die T-Zell-Aktivierung durch DZ *in vitro* kostimulationsabhängig ist. Als Referenzsystem wurde der bereits bekannte Einfluss des CD28-Signalwegs auf die IL-2-Produktion initial aktivierter T-Zellen gewählt (Poggi *et al.*, 1987). Hierzu wurden Ova-peptidspezifische CD4 T-Zellen mit CD11c⁺ DZ aus der Milz bei verschiedenen TZ-DZ Verhältnissen und unterschiedlichen Ova-Peptid Konzentrationen für 48 h kokultiviert. Der CD28-Signalweg wurde währenddessen durch die Zugabe des Fusionsproteins huCTLA-4-hulgG blockiert. Als Kontrollen dienten ein Ansatz ohne Blockade (Mediumkontrolle), ein Ansatz in dem die Interaktion des MHC-II/Peptid-Komplexes mit dem TZR durch einen blockierenden Antikörper unterbrochen wurde (M5/114.15.2) und eine Isotypenkontrolle.

Nach zwei Tagen in Kultur wurde die IL-2-Produktion der Kokulturen im Überstand mittels ELISA gemessen.

Die Blockade der T-Zell-Kostimulation durch CD80 und CD86 führte bei allen gewählten Bedingungen zu einer Hemmung der IL-2-Produktion (Abb.6). Die Menge an produziertem IL-2 ist von der Ova-Peptid-Konzentration und der Menge eingesetzter DZ abhängig. Je weniger Ova-Peptid und DZ in der Kokultur vorhanden waren, desto weniger IL-2 wurde produziert. Der stärkste Effekt auf die Unterdrückung der IL-2-Produktion ergab sich bei einem TZ : DZ-Verhältnis von 1:1 und einer Ova-Peptid Menge von 0,06 µg/ml. Mit 20 ng/ml wurde unter diesen Bedingungen eine gut messbare Menge an IL-2 produziert. Unter der Annahme, dass die Zytokinproduktion der T-Zellen bei den Bedingungen, unter denen die CD28 Blockade den größten Effekt auf die IL-2 Produktion hatte, besonders kostimulationsabhängig ist, wurden sie für die weiteren Experimente übernommen.



Abb. 6: Ermittlung der Bedingungen für Kokulturen aus Ova-peptidspezifischen TZ und Milz-DZ. DO11.10-TZ und mit Ova-peptid beladene DZ aus der Milz wurden für 2 Tage kokultiviert. Der CD28 Signalweg wurde durch huCTLA-4-hulgG blockiert ("CTLA-4-Ig"). Als Kontrolle diente die Blockade der Interaktion des MHC/Antigen-Komplexes mit dem T-Zell-Rezeptor durch einen MHC-II-spezifischen, blockierenden Antikörper sowie Medium ohne Blockadereagenzien ("Medium") und eine Isotypenkontrolle für den anti-MHC-II Antikörper ("Isotyp").

III.2.3 Die Blockade des ICOS-Signalwegs während der primären Stimulation naiver antgigenspezifischer T-Zellen führt zu einer erhöhten Produktion von IFN-γ und IL-10

Der ICOS-Signalweg wurde während der initialen Aktivierung antigenspezifischer TZ durch DZ und Peptid durch das Fusionsprotein mu-ICOS-hulgG unterbrochen (vgl. Abb. 5 A). Als Kontrollen wurden huCTLA-4-hulgG und anti-MHC-II (M5/114.15.2) eingesetzt.

Zwei Tage nach primärer Stimulation wurden die Kulturüberstände entnommen und bei -70°C gelagert. Die Produktion von IL-4, IFN-γ und IL-10 wurde mittels ELISA gemessen (Abb. 7).

Alle Zytokine wurden in der Mediumkontrolle detektiert. Die Blockade der MHC-II-Peptid/TZR-Interaktion resultierte in einer annähernd kompletten Inhibition der Produktion der Zytokine verglichen mit der Mediumkontrolle. Die Blockade der B7-1 bzw. B7-2/CD28-Interaktion zeigte selektiv auf die Produktion von IFN- γ einen ähnlichen Effekt (ca. 70% Reduktion der Zytokinproduktion verglichen mit der Kontrolle). Die Blockade des ICOS-Signalwegs zeigte eine marginale Auswirkung auf die Produktion von IL-4. Allerdings wurde die Produktion von IFN- γ durch die Blockade verglichen mit der Mediumkontrolle um ca. 50 % und die Produktion von IL-10 um ca. 60 % erhöht.



Abb. 7: Zytokinproduktion in der Kokultur aus antigenspezifischen TZ mit DZ und Peptid nach initialer T-Zell-Aktivierung bei Blockade des ICOS/ICOS-L-Signalwegs. DO11.10-TZ und Ova-Peptid beladene DZ aus der Milz wurden für 2 Tage kokultiviert. Der ICOS/ICOS-L-Signalweg wurde durch muICOS-hulgG blockiert ("ICOS-Ig"). Als Kontrollen wurden in verschiedenen Ansätzen entweder der CD28-Signalweg durch huCTLA-4-hulgG ("CTLA-4-Ig") blockiert, die Interaktion des MHC-II/Peptidkomplexes mit dem TZR durch einen blockierenden

Antikörper mit Spezifität für murines MHC-II unterbrochen ("MHC-II") oder eine Isotypenkontrolle bzw. eine Mediumkontrolle verwendet ("Isotyp" bzw. "Medium"). Die Zytokine im Überstand wurden durch ELISA gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten. N. d. = nicht detektierbar.

III.2.4 Die Blockade des ICOS-Signalwegs während der primären Stimulation naiver, antigenspezifischer T-Zellen führt nach Restimulation dieser Zellen zu einer erhöhten Produktion von IFN-γ und einer reduzierten Produktion von IL-4

Die Zytokinproduktion in der Kokultur wurde nach Restimulation von T-Zellen analysiert, die zuvor unter Blockade des ICOS/ICOS-L-Systems aktiviert worden waren. Dazu wurde der ICOS/ICOS-L-Signalweg in der primären Kokultur (d1-d2) durch Fusionsprotein unterbrochen. Es wurden dieselben Kontrollansätze wie unter II.2 verwendet. Danach folgte eine Ruhephase von 3 Tagen (d3-d5). Die Zellen wurden am Tag 5 gewaschen und mit frischem Peptid und DZ ohne Blockadereagenzien restimuliert (vgl. Abb.: 5 B). Die Produktion von IL-4, IFN- γ und IL-10 wurde einen Tag nach Restimulation mittels ELISA gemessen (Abb.8).

Alle Zytokine wurden in der Mediumkontrolle detektiert. Die Blockade der MHC-II-Peptid/TZR-Interaktion resultierte in vollständiger Inhibition der Produktion aller untersuchten Zytokine verglichen mit der Isotypenkontrolle. Die Blockade der B7-1- bzw. B7-2/CD28-Interaktion bewirkte ebenfalls eine reduzierte Produktion der Zytokine, allerdings weniger drastisch (ca. 90 % Reduzierung der Produktion von IL-4, 60 % von IFN-γ und ca. 75 % von IL-10).

Demgegenüber führte die Blockade des ICOS/ICOS-L Systems zu einem differenzierteren Zytokinmuster der Kokulturen: Die Produktion von IL-4 wurde um mindestens 50 % verglichen mit der Mediumkontrolle gesenkt; die Produktion von IFN-γ jedoch um ca. 50 % erhöht. Die IL-10-Produktion wurde nicht beeinflusst.



Abb.8: Zytokinproduktion nach Restimulation von antigenspezifischen TZ, die zuvor unter Blockade der ICOS/ICOS-L-Interaktion durch DZ und Peptid primär aktiviert worden sind. DO11.10-TZ wurden durch mit Ova-Peptid beladene DZ aus der Milz für zwei Tage primär stimuliert. Dabei wurde die ICOS/ICOS-L-Interaktion durch muICOS-hulgG blockiert ("ICOS-Ig"). Als Kontrollen wurden in verschiedenen Ansätzen entweder der CD28 Signalweg durch huCTLA-4-hulgG ("CTLA-4-Ig) blockiert, die Interaktion des MHC-II/Peptidkomplexes mit dem TZR durch einen blockierenden Antikörper mit Spezifität für murines MHC-II unterbrochen ("MHC-II") oder eine Isotypenkontrolle bzw. eine Mediumkontrolle verwendet ("Isotyp" bzw. "Medium"). Nach einer Ruhephase wurden die T-Zellen gewaschen und mit frischem Peptid und DZ ohne den Zusatz von Blockadereagenzien restimuliert. 1 Tag später wurde die Zytokinkonzentration im Überstand der Kokulturen mittels ELISA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten. N.d. = nicht detektierbar.

III.2.5 Überprüfung der Ergebnisse der Kokulturexperimente mit ICOS-defizienten, antigenspezifischen T-Zellen

Die Ergebnisse aus den Kokultur-Experimenten mit den Blockadereagenzien wurden mit Zellen von ICOS-defizienten, BALB/c DO11.10-Mäusen überprüft. Dazu wurden TZ aus ICOS-defizienten oder "WT" BALB/c DO11.10-Mäusen zusammen mit DZ und Ova-Peptid kokultiviert. Die Zytokinproduktion in den Kokulturen mit ICOS-defizienten TZ wurde mit der Produktion in Kokulturen mit "WT"-TZ verglichen. Der Aufbau der Kokulturen entsprach Kap. II.2 und II.3 mit

Ausnahme der Blockadereagenzien, die in diesen Ansätzen nicht eingesetzt wurden. Es wurden mehrere DZ:TZ-Zellverhältnisse bei einer Ova-Peptid Konzentration von 0,05 μ g/ml eingesetzt und untersucht (1:3, 1:30, 1:300). Die Zytokinkonzentration im Überstand der Kokulturen wurde entweder unmittelbar nach initialer Aktivierung durch die TZ am Tag 2 oder nach einer Expansionsphase (Tag 3-5) und darauf folgender Restimulation (Tag 5-6) analysiert. Vor der Restimulation wurden die T-Zellen mehrmals gewaschen. Während der Expansionsphase wurde ggf. frisches Medium zugegeben, da die TZ in einigen Ansätzen stark proliferierten. Als Kontrollen dienten während der primären Stimulation ein Ansatz ohne Peptid sowie ein Ansatz ohne DZ und bei der Restimulation ein Ansatz ohne Peptid. Im Überstand der Kokulturen wurden IL-4, IL-10, IFN- γ und IL-2 (IL-2 nur nach primärer Stimulation) mit einem "Cytometric Bead Assay" (Bioplex, Bio-Rad) analysiert (Abb. 9).

Die Ergebnisse für die Ansätze mit den unterschiedlichen DZ:TZ-Verhältnissen waren qualitativ ähnlich; bei einem geringeren Anteil von DZ in der Kokultur war die produzierte Zytokinmenge lediglich insgesamt sowohl in den Ansätzen mit "WT" (Wildtyp) -TZ, als auch in denen mit ICOS-KO TZ geringer. Daher ist hier repräsentativ das Ergebnis der Ansätze mit einem DZ:TZ-Zellverhältnis von 1:3 gezeigt.

Alle untersuchten Zytokine wurden in den Kokulturen sowohl nach primärer, als auch nach sekundärer Stimulation detektiert. In den Ansätzen ohne Peptid wurde keine detektierbare Menge an Zytokin produziert. In den Ansätzen mit naiven TZ und Peptid alleine ohne DZ wurden nur sehr geringe Zytokinmengen detektiert. Nach primärer Stimulation ICOS-defizienter T-Zellen durch DZ und Peptid wurde im Überstand der Kokulturen im Vergleich zur Stimulation von "WT"-T-Zellen eine um einen Faktor von 3,5 erhöhte Konzentration an IFN- γ und eine um einen Faktor von ca. 2 gesteigerte Konzentration an IL-10 detektiert. Für IL-2 und IL-4 ergaben sich keine Unterschiede.

Nach sekundärer Stimulation wurde in den Kokulturen mit ICOS-defizienten TZ verglichen mit den Kokulturen mit "WT"-T-Zellen eine um ca. 50% reduzierte Konzentration an IL-4 detektiert und die Menge an produziertem IFN-γ war in den Ansätzen mit ICOS-KO-TZ um einen Faktor von mindestens 10 erhöht.

Somit stimmen die Ergebnisse aus diesem experimentellen System mit ICOSdefizienten T-Zellen qualitativ mit den Ergebnissen aus den Experimenten, in denen die ICOS/ICOS-L-Interaktion durch Fusionsprotein blockiert wurde überein (vgl. Abb. 7-9):

In beiden Systemen wurde nach primärer Stimulation bei fehlender ICOS/ICOS-L-Interaktion eine erhöhte Menge an IFN-γ und IL-10 gemessen und auf die IL-4-Produktion wurde kein Unterschied festgestellt.

Bei der sekundären Stimulation führte das Fehlen der Interaktion von ICOS mit seinem Liganden zu einer stark erhöhten Produktion von IFN-γ und einer Verringerung der IL-4-Konzentration in der Kokultur. Die Menge an produziertem IL-10 wurde hier nicht beeinflusst.

Neben der Produktion von IL-4, IFN-γ und IL-10 wurde in beiden Systemen auch die Produktion von IL-2 untersucht. Dabei hatte das Fehlen von ICOS-Kostimulation im Gegensatz zu fehlender CD28-Kostimulation keinen Einfluss auf die IL-2-Produktion (Abb. 6 und Daten nicht gezeigt).



Abb. 9: Überprüfung der Kokulturexperimente mit ICOS-defizienten T-Zellen. ICOSdefiziente oder "WT" Balb/c DO11.10-Mäuse wurden mit DZ und Ova-Peptid kokultiviert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Peptid ("ohne Peptid") oder von TZ mit Peptid, jedoch ohne DZ ("TZ"). 48 h nach primärer Stimulation und 24 h nach Restimulation wurden die Zytokine im Überstand der Kokulturen durch einen "Cytometric Bead Assay" (Bioplex, Bio-Rad) analysiert. Weiße Balken: Kokultur mit antigenspezifischen "WT"-TZ, schwarze Balken: ICOS-KO-TZ, n.d.: nicht detektierbar.

III.3 Regulation des ICOS-L auf murinen DZ

III.3.1 Die ICOS-L-Expression auf DZ wird durch Zytokine und pathogenspezifische Stimuli beeinflusst

Die ICOS-L-Expression auf Endothelzellen und auf naiven B-Zellen wird durch inflammatorische Stimuli beeinflusst (Kahyyamian *et al.*, 2002, Liang *et al.*, 2002). Dazu gehören Zytokine wie IL-4 und TNF-α, aber auch bakterielle Moleküle wie LPS. DZ besitzen Zytokinrezeptoren und Rezeptoren für pathogenspezifische Molekülstrukturen, die "Toll like Rezeptoren" (TLR). Bekannt sind TLR mit verschiedenen Spezifitäten für LPS, bakterielle Lipoproteine und Lipoteichoische Säuren, Flagellin, unmethylierte CpG DNA von Bakterien und Viren, doppelsträngige und einzelsträngige (virale) RNA. Die Expression von TLR unterscheidet sich zwischen DZ Subpopulationen. TLR-Stimulation aktiviert unreife DC und führt zur verstärkten Expression von MHC-Molekülen für die Antigenpräsentation, kostimulatorischen Liganden und Chemokinrezeptoren (Übersichtsartikel: Iwasaki *et al.*, 2004).

In den vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass die Interaktion des ICOS-L auf DZ mit ICOS auf TZ die Differenzierung von antigenspezifischen TZ nach Aktivierung beeinflusst (Kap. II). Daher ist die Regulation der Expression des Moleküls auf DZ möglicherweise ein wichtiger Faktor für die Ausrichtung einer Immunantwort. Aus diesem Grunde wurde der Einfluss von Zytokinen und pathogenspezifischen Molekülstrukturen auf die Expression des ICOS-L vergleichend mit der Expression anderer B7-Moleküle analysiert. Dabei wurde zwischen CD8⁺-und CD8⁻-DZ unterschieden.

DZ wurden aus der Milz durch MACS aufgereinigt und für 20 h mit GM-CSF (12,5 ng/ml), IL-3 (12,5 ng/ml), IL-10 (12,5 ng/ml), IL-4 (15 ng/ml), IFN-γ (15 ng/ml), IL-12 (15 ng/ml), TNF-α (100 U/ml), LPS (10 µg/ml), pI:C (50 µg/ml) oder Medium als Kontrolle kultiviert. Die Expression von ICOS-L, CD80, CD86, PD-L1 und PD-L2 auf der Zelloberfläche von CD8⁺-und CD8⁻-DZ wurde anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

Der Einfluss der Reagenzien auf die Expression der Oberflächenmarker wurde mit dem Einfluss der spontanen Aktivierung der Zellen in Kontrollmedium verglichen. Dabei zeigte sich ein komplexes Bild:

Die Expression des ICOS-L wird von verschiedenen Reagenzien auf unterschiedlichen DZ-Subpopulationen beeinflusst. Allerdings wurde ICOS-L dabei nie über die spontane Aktivierung der Zellen hinaus heraufreguliert, sondern ausschließlich in der Expression gehemmt. GM-CSF und IFN- γ hemmten die ICOS-L Expression auf CD8⁺-und CD8⁻-DZ und LPS sowie pI:C auf CD8 α^+ –DZ. Die anderen untersuchten Reagenzien zeigten keinen Einfluss auf die ICOS-L-Expression (IL-10, IL-12 und TNF- α sind nicht gezeigt). Damit unterscheidet sich ICOS-L von den anderen B7-Liganden, deren Expression von mindestens einem Teil der Reagenzien gesteigert wurde.

Besonders auffällig verhält sich PD-L2. Das Molekül wurde durch alle untersuchten Reagenzien heraufreguliert, durch LPS und pI:C allerdings selektiv auf CD8⁺-Zellen.



Abb.10: Expression von B7-Molekülen auf CD8α⁻-und CD8α⁺-DZ nach Inkubation mit Zytokinen und pathogenspezifischen Stimuli im Vergleich mit dem Einfluss der spontanen Aktivierung in Medium. DZ aus der Milz wurden durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen für 20 h mit den angegebenen Reagenzien inkubiert und in der Durchflusszytometrie untersucht. CD8⁺-bzw. CD8⁻-DZ wurden anhand der Expression von MHC-II, CD11c und CD8 ausgewählt. Offene Histogramme: Mediumkontrolle, gefüllte Histogramme: Inkubation mit Reagenzien. Das Ergebnis wurde durch drei ähnliche Experimente bestätigt.

III.3.2 Die ICOS-L-Expression auf DZ wird durch Infektion mit dem Murinen Zytomegalovirus (MCMV) herunterreguliert

Die Infektion von DZ mit MCMV führt zu einer starken Herunterregulation von Zelloberflächenmolekülen, die bei der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielen, wie z.B. MHC Klasse I und II oder CD40. Andrews et al. haben gezeigt, dass dies auch auf die klassischen Moleküle aus der B7-Familie kostimulatorischer Liganden, CD80 und CD86 zutrifft (Andrews et al., 2001). Kürzlich wurde ein MCMV-kodiertes Gen identifiziert, das für die Herunterregulation von CD86 von murinen DZ verantwortlich ist (Loewendorf et al., 2004). Da ICOS-L zu derselben Protein-Superfamilie wie CD80 und CD86 gehört und auf murinen DZ eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielt wurde untersucht, ob die Expression des ICOS-L auf murinen DZ durch MCMV-Infektion beeinflusst wird. CD11c⁺-DZ aus der Milz wurden dazu durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen in einer in vitro Kultur mit in der Speicheldrüse propagiertem MCMV (Stamm Smith) infiziert ("multiplicity of infection" [MOI] = 5). Als Kontrolle dienten mock-infizierte Zellen. 24 h später wurde die Oberflächenexpression der B7-Liganden ICOS-L, PD-L1 und PD-L2 im Vergleich zu CD80 und CD86 mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb.11).

Im Gegensatz zu mock-infizierten DZ wurde bei MCMV-infizierten Zellen eine starke Herunterregulation von CD80, CD86, PD-L2 und ICOS-L beobachtet. Demgegenüber blieb die Expression von PD-L1 unbeeinflusst.

Ähnliche Experimente, die mit einem Virus durchgeführt wurden, der GFP mittels eines Promotors für die früh exprimierten MCMV-Gene ("immediateearly genes") exprimierte, führten zu einem gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).



Abb.11: MCMV-infizierte DZ regulieren ICOS-L herunter. CD11c⁺ DZ aus den Milzen von C57/BI6-Mäusen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS aufgereinigt, mit MCMV Stamm Smith infiziert (MOI = 5, offene Histogramme) oder mock-infiziert (graue Histogramme). Die angezeigten Oberflächenmoleküle wurden 24 h nach Infektion im Durchflusszytometer untersucht. Gezeigt ist eins von drei unabhängigen Experimenten.

III.3.3 Der Faktor für die Herunterregulation von ICOS-L auf infizierten Zellen ist viral codiert und liegt in der Region m128-m139

MCMV führt im immunkompetenten Wirt nach einer akuten Phase zu einer lange anhaltenden latenten, asymptomatischen Infektion. Ursache dafür sind zahlreiche virale Faktoren, mit denen das Virus der Immunantwort entgeht. Dazu gehört z.B. die Herunterregulation aktivierender NK-Zell-Rezeptoren oder die Herunterregulation von Liganden für Kostimulatoren der B7-Familie wie CD86. Die Herunterregulation des ICOS-L auf murinen, MCMV-infizierten DZ könnte ein weiterer wichtiger Immunevasionsmechanismus des Virus sein. Daher wurde untersucht, welcher genetische Faktor für die Herunterregulation verantwortlich ist. Dazu wurden von Prof. H. Hengel, Abt. für Virologie, Universität Düsseldorf, und Herrn Dr. M. Wagner, Bavarian Nordic AS, München, neben dem WT MCMV MW97.01, der genetisch dem WT des MCMV-Stammes Smith entspricht (Wagner *et al.*, 1999) verschiedene MCMV-Mutanten zur Verfügung gestellt, die unterschiedliche Gen-Deletionen aufwiesen (Tab.I).

Virus (-mutante)	Deletierter offener Leserahmen
Δ6	m144-m158
Δ7	m159-m170
Δ8	m1-m22
Δ20	m128-m139
MW97.01	keiner (entspricht genetisch dem WT Stamm Smith)

Tab. 13: Übersicht der rekombinanten MCMV (-Mutanten).Verschiedene Virus (-mutanten),die unterschiedliche Gen-Deletionen aufweisen.

III.3.3.1 Infektion von primären DZ mit MCMV-Deletionsmutanten

Dendritische Zellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS aus der Milz von BALB/c-Mäusen aufgereinigt. Die Zellen wurden anschließend mit verschiedenen MOI MCMV MW97.01 oder den Virusmutanten $\Delta 8$ bzw. $\Delta 20$ infiziert. 20 h nach Infektion wurde die Expression des viralen, "immediateearly" Genproduktes pp89 als Infektionsmarker (Koszinowski *et al.*, 1986) im Durchflusszytometer untersucht (Abb. 12).

Je höher die verwendete MOI war, desto größer war der Anteil an infizierten Zellen (nicht gezeigt). Die Infektionseffizienz des MCMV MW97.01 und seiner genetischen Derivate war sehr schlecht in DZ. Das Maximum an pp89-Expression lag bei der Infektion mit einer MOI von 100 bei ca. 10% für die Virusmutante $\Delta 8$, die Mutante $\Delta 20$ erreichte nur 1,4%. Primäre murine DZ lassen sich demnach nur sehr schlecht mit den MCMV-Deletionsmutanten infizieren, da selbst bei einer vergleichsweise hohen MOI von 100 plaquebildenden Einheiten (Pfu) pro Zielzelle nur eine Infektionsrate von max. 10% erreicht wurde.



Abb. 12: MCMV-Deletionsmutanten können primäre murine DZ nur schlecht infizieren

DZ aus der Milz von BALB/c-Mäusen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS aufgereinigt. Die Zellen wurden mit den angezeigten Viren infiziert (MOI = 100). 20 h nach Infektion wurde die intrazelluläre Expression des "immediate-early" Genprodukts pp89 als Maßstab für die Infektionseffizienz im Durchflusszytometer analysiert (durchgezogene Histogramme). Als Färbekontrolle wurde ein Isotyp der verwendeten Antikörper benutzt (gepunktete Histogramme). Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

III.3.3.2 Infektion von NIH 3T3 ICOS-L Transfektanten mit MCMV-Deletionsmutanten

Da sich primäre DZ nicht ausreichend mit den MCMV-Mutanten infizieren ließen, wurde für die weiteren Experimente mit der Zelllinie NIH 3T3 gearbeitet, die mit MCMV leicht infizierbar ist (Muller *et al.*, 1977). Es wurden ICOS-L-exprimierende NIH 3T3 Transfektanten hergestellt und mit den jeweiligen Viren (-Mutanten) für 24 h infiziert (MOI = 5). Anschließend wurde die ICOS-L Expression auf den infizierten Zellen im Durchflusszytometer gemessen (Abb. 13 und 14). Infizierte Zellen wurden durch die Expression von pp89 in Kombination mit der durch die Infektion leicht erniedrigten Expression von MHC-I als "Surrogatmarker" identifiziert (Abb. 13).

Die Infektion der NIH 3T3 ICOS-L-Transfektanten mit dem Wildtypvirus

MW97.01 reduzierte die ICOS-L-Expression im Vergleich zu mock-infizierten Zellen ähnlich, wie es zuvor bei primären DZ beobachtet wurde (Geo. M. von 382 auf MW97.01-infizierten Zellen gegenüber einem geo. M. von 1717 auf mock-infizierten Zellen). Die Zellen, die mit dem Virus inkubiert wurden, waren

nach 24 h nicht alle infiziert (Abb. 13, Region A, Infektionsrate ca. 80% nach 24 h). Diese verbliebenen uninfizierten Zellen wiesen eine ähnlich starke ICOS-L-Expression auf ihrer Zelloberfläche auf wie mock-infizierte Zellen (Geo. M. von 1755 auf mit MW97.01 inkubierten aber uninfizierten Zellen [Region A] gegenüber einem geo. M. von 1717 auf mock-infizierten Zellen). Die Inkubation der Zellen mit den Viren über einen längeren Zeitraum führte letzten Endes zu einer vollständigen Infektion aller Zellen, die mit einer weiteren Herunterregulation von ICOS-L einherging (nicht gezeigt).



Abb. 13: Die Infektion der NIH 3T3 ICOS-L-Transfektanten mit dem Wildtypvirus

MW97.01 reduziert die ICOS-L-Expression auf der Zelloberfläche. NIH 3T3 ICOS-Lexprimierende Transfektanten wurden entweder mock-infiziert oder mit Wildtyp MCMV MW97.01 infiziert (MOI = 5). 24 h nach Infektion wurde die ICOS-L Expression im Durchflusszytometer gemessen. Infizierte Zellen wurden durch die Expression des "immediateearly" Proteins pp89 und von MHC-I als Surrogatmarker identifiziert (vgl. *dot-blot*-Darstellung, Region A = uninfizierte Zellen, Region B = infizierte Zellen) und sind in den Histogrammen dargestellt. Durchgezogene Linie: ICOS-L-Expression, gepunktete Linie: Isotypenkontrolle. Die Zahlen geben den geo. M. der Färbehelligkeit des ICOS-L an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten. Die rekombinanten Viren $\Delta 6$, $\Delta 7$, und $\Delta 8$, denen jeweils die Gene m144–158, m159–170 oder m1-22 fehlen, waren ähnlich effizient in der Herunterregulation von ICOS-L wie das WT-Virus (Abb. 14: geo. M. der Virus-Mutanten zwischen 479 und 945, geo. M. von MW97.01 = 413). Im Gegensatz dazu blieb die ICOS-L-Expression bei der Infektion mit der Virusmutante $\Delta 20$, welcher die Gene m128-m139 fehlen, nahezu unbeeinflusst (geo. M. von $\Delta 20$ = 3538, von "mock" = 3705).



Abb. 14: Die MCMV-Deletionsmutante ∆20 kann ICOS-L nicht von der Zelloberfläche von NIH 3T3 ICOS-L Transfektanten herunterregulieren. NIH 3T3 ICOS-L-exprimierende Transfektanten wurden entweder mock-infiziert oder mit Wildtyp MCMV MW97.01 bzw. den angezeigten Deletionsmutanten infiziert (MOI = 5). 24 h nach Infektion wurde die ICOS-L Expression im Durchflusszytometer gemessen. Infizierte Zellen wurden durch die Expression des "immediate-early" Proteins pp89 und von MHC-I als Surrogatmarker identifiziert und sind in den Histogrammen dargestellt. Durchgezogene Linie: ICOS-L-Expression, gepunktete Linie: Isotypenkontrolle. Die Zahlen geben den geo. M. der Färbehelligkeit des ICOS-L an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

III.3.4 Der virale Fc-Rezeptor m138/fcr-1 ist für die Herunterregulation von ICOS-L notwendig

Innerhalb der Region der Gene, die bei der Δ20-Mutante fehlen, liegt der offene Leserahmen des viralen Fc-Rezeptors m138/fcr-1. Dabei handelt es sich um ein Transmembran-Glykoprotein vom Typl bestehend aus 569 Aminosäuren. Dieser Rezeptor bindet stark an den Fc-Teil von murinem IgG (Thäle *et al.*, 1994). Das Molekül liegt auf der Zelloberfläche vor, wird jedoch noch stärker intrazellulär exprimiert (Lenac *et al.*, 2006). *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass

ein Virus mit einer Deletion des m138/fcr-1 Gens während der primären MCMV-Infektion stark attenuiert ist, auch bei der Abwesenheit von Antikörpern (Crnkovic-Mertens *et al.*, 1998). Das ist ein Hinweis auf mögliche weitere Funktionen von m138/fcr-1, die nicht von seiner Fähigkeit zur Bindung von Antikörpern abhängen.

Von Prof. H. Hengel, Universität Düsseldorf, Abt. für Virologie, wurde eine MCMV-Mutante zur Verfügung gestellt, bei der das m138/fcr-1-Gen durch eine Leseraster-Verschiebung verändert und somit nicht mehr funktionell ist.

Diese Mutante kann kein fcr-1/m138-Protein mehr produzieren (Lenac *et al.*, 2006). Als Kontrolle dafür, dass bei der Mutante wirklich nur das relevante Gen deletiert ist, diente ein Revertantenvirus (m138REV), bei dem das zuvor deletierte Gen m138/fcr-1 nachträglich wieder eingefügt worden war (Lenac *et al.*, 2006). Die Zellen wurden wie in Kapitel II.8.5 beschrieben infiziert (MOI = 5) und die ICOS-L-Expression der infizierten Zellen wurde 24 h später mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abb.15).

Die ICOS-L-Expression in den mit der Virusmutante Δ m138FSH infizierten Zellen wurde nur sehr schwach beeinträchtigt und blieb ungefähr auf dem gleichen Niveau wie bei mock-infizierten Zellen. Die Infektion der Transfektanten mit dem m138/fcr-1 Revertantenvirus führte demgegenüber zu einer deutlichen Herunterregulation von ICOS-L von der Zelloberfläche, ähnlich wie bei der Infektion mit dem WT-Virus (MW97.01: geo. M. = 1911, m138REV: geo. M. = 1379, "mock"-Infektion: geo. M. = 6919).



Abb. 15: Der FcγR m138/fcr-1 ist für die Herunterregulation von ICOS-L verantwortlich NIH 3T3 ICOS-L Transfektanten wurden mock-infiziert oder mit dem Wildtyp MCMV MW97.01, Δm138FSH, oder der Revertante m138REV infiziert (MOI = 5). 24 h nach Infektion wurde die

ICOS Expression im Durchflusszytometer gemessen. Infizierte Zellen wurden durch die Expression des "immediate-early" Proteins pp89 identifiziert und sind in den Histogrammen dargestellt. Durchgezogene Linie: ICOS-L-Expression, gepunktete Linie: Isotypenkontrolle. Die Zahlen geben den geo. M. der Färbehelligkeit des ICOS-L an. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

III.3.5 Die Expression des viralen Fc-Rezeptors m138/fcr-1 ist ausreichend für die Herunterregulation von ICOS-L

Der Verlust des fcr-1/m138-Gens führte dazu, das die Herunterregulation des ICOS-Liganden von der Oberfläche infizierter Zellen durch MCMV massiv beeinträchtigt war. Möglicherweise ist auch das Zusammenspiel mehrerer viraler Faktoren für die komplette Herunterregulation notwendig. Daher sollte überprüft werden, ob das m138-Protein alleine dazu in der Lage ist, diesen Phänotyp herbei zu führen oder ob eventuell noch weitere virale Faktoren dazu notwendig sind. Zu diesem Zweck wurden in Zusammenarbeit mit M. Budt, Abt. Virale Infektionen, Robert Koch-Institut, Berlin, Systeme zur gezielten Expression des m138/fcr-1-Proteins in ICOS-L tragenden Zellen entwickelt.

Zunächst wurden 293T-Zellen mit dem bizistronischen Konstrukt pIRES2-m138-EGFP transfiziert, das eine gleichzeitige Expression von m138/fcr-1 und EGFP als Fluoreszenzmarker bewirkt. Gleichzeitig wurden sie mit einem Expressionsplasmid für ICOS-L (pcDNAZ-ICOS-L) kotransfiziert. Zur Kontrolle wurde alternativ zum m138 exprimierenden Konstrukt ein weiteres bizistronisches Konstrukt verwendet, das das vom humanen Zytomegalovirus (CMV) codierte Gen US2, einen Regulator von MHC-Klasse I-Molekülen, exprimiert (pIRES2-US2-EGFP).

24 h nach Transfektion wurden EGFP-exprimierende Zellen in der Durchflusszytometrie identifiziert und auf die Expression von ICOS-L hin analysiert (Abb.18).

Ca. 20-25 % aller untersuchten Zellen waren erfolgreich mit den Konstrukten pIRES2-US2-EGFP oder pIRES2-m138-EGFP transfiziert worden und exprimierten EGFP. Bei gleichzeitiger Transfektion von ICOS-L und fcr-1/m138 exprimierten ca. 8 % der EGFP-exprimierenden Zellen ICOS-L. Bei Transfektion von ICOS-L mit dem Kontrollprotein US2 war dagegen der Anteil der ICOS-L-exprimierenden Zellen an den EGFP-positiven Zellen mit ca. 29 %

deutlich höher. Die gleichzeitige Expression von ICOS-L mit m138/fcr-1 führte im Vergleich zur Kontrolle also zu einer reduzierten Oberflächenexpression von ICOS-L.

Das Ergebnis wurde durch einen zweiten unabhängigen Ansatz überprüft. Dazu wurde das bizistronische Expressionskonstrukt pIRES2-m138-ICOS-L hergestellt. Es ermöglicht die gleichzeitige Expression von fcr-1/m138 und ICOS-L auf einem einzigen Plasmid, was eine einheitliche, gleichzeitige Transfektion beider Gene gewährleistet. Als Kontrolle dazu diente das Expressionsplasmid pIRES2-m155-ICOS-L, das anstatt des fcr-1/m138 das virale Glykoprotein m155, einen spezifischen Regulator des NKG2D-Liganden H60, zusammen mit ICOS-L exprimiert. Fcr-1/m138 wurde im Durchflusszytometer durch FITC-markiertes Maus IgG-Fc-Fragment detektiert. M155 wurde mit einer FLAG-Markierung exprimiert und mittels eines monoklonalen Antikörpers mit Affinität zu FLAG nachgewiesen.

24 h nach Transfektion wurden die Zellen in der Durchflusszytometrie untersucht. Fcr-1/m138- oder m155-exprimierende Zellen wurden durch die Bindung an murines IgG-Fc-Fragment bzw. an einen anti-Flag-Antikörper identifiziert. Danach wurde die Expression von ICOS-L auf der Plasmamembran der m155 oder fcr-1/m138 exprimierenden Zellen analysiert (Abb. 16).

Die Zellen, in denen ICOS-L zusammen mit fcr-1/m138 exprimiert wurde, weisen einen geo. M. von 25 für die Expression des ICOS-L auf der Zelleoberfläche auf. Demgegenüber lag der geo. M. für Zellen, in denen ICOS-L zusammen mit der Kontrolle exprimiert wurde, bei 83. Die Zellen, in denen ICOS-L mit fcr-1/m138 zusammen exprimiert wurde, weisen demnach eine deutlich schwächere ICOS-L-Expression auf als die Zellen, in denen ICOS-L mit dem Kontrollprotein exprimiert wurde.



Abb. 16: Die Expression von m138 ist ausreichend für die Herunterregulation von ICOS-L auf NIH 3T3 Transfektanten. A: 293T-Zellen wurden transient mit den Vektoren pcDNAZ-ICOSL und pIRES2-m138-EGFP oder pIRES2-US2-EGFP (als Kontrolle) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen, die fcr-1/m138 oder das Kontrollprotein exprimierten, wurden anhand ihrer EGFP-Expression ausgewählt und die Expression des ICOS-L wurde auf der Zelloberfläche untersucht. B: 293T-Zellen wurden entweder mit dem Vektor pIRES2-m138-ICOS-L oder IRES2-m155-ICOS-L transfiziert, welche die gemeinsame Expression von ICOS-L mit m138 oder m155 auf dem gleichen Plasmid erlauben. Die Expression von ICOS-L auf der Oberfläche m138 oder m155 produzierender Zellen wurde 24 h nach Transfektion im Durchflusszytometer gemessen. Offene Histogramme: ICOS-L- Expression, gepunktete Histogramme: ungefärbte Kontrolle. Die Zahlen geben den geometrischen Mittelwert der Expressionsstärke des ICOS-L an. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

III.3.6 ICOS-L und fcr-1/m138 sind bei gleichzeitiger Expression intrazellulär kolokalisiert

Zur initialen Analyse des Mechanismus der Herunterregulation von ICOS-L durch fcr-1/m138 wurden NIH 3T3 ICOS-L-Transfektanten mit MCMV-GFP (Stamm Smith) infiziert. Anschließend wurden ICOS-L und fcr-1/m138 angefärbt und Ihre Verteilung mit einem Laser Scanning Mikroskop (LSM) analysiert. Die Infektion der Zellen erfolgte für 20 h mit einer MOI von 3. Fcr-1/m138 und ICOS-L wurden sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär angefärbt. Als Kontrollen dienten uninfizierte Transfektanten, WT NIH 3T3-Zellen und die Isotypenkontrollen der verwendeten Antikörper.

Die Zellen befinden sich in verschiedenen Phasen einer Infektion (Abb. 17). Die infizierten Zellen zeigen eine deutliche GFP-Fluoreszenz, insbesondere im Zellkern (Abb. 17 B und D, grün). ICOS-L wird von uninfizierten Zellen und von einem Teil der infizierten Zellen exprimiert (Abb. 17 A und D, blaue Färbung). Die Zellen, die kein ICOS-L mehr auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, sind stark infiziert, sie weisen eine hohe GFP-Expression auf. Fcr-1/m138 wird von einem Teil der MCMV-infizierten Zellen intrazellulär exprimiert (Abb. 17 C und D, rote Färbung). Wenn ICOS-L und fcr-1/m138 in einer Zelle exprimiert werden, so sind sie intrazellulär kolokalisiert (pink bei Überlagerung der einzelnen Farben, Abb. 17 D, siehe Markierung durch den Pfeil).



Abb. 17: Konfokale Analyse der Expression von ICOS-L (blau), m138/fcr-1 (rot) und MCMV-GFP (grün) in NIH 3T3 ICOS-L Transfektanten 20 h nach Infektion. NIH 3T3 ICOS-L-Transfektanten wurden mit GFP ("green fluorescent protein") -transgenen MCMV Stamm Smith infiziert, (MOI = 3). 20 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit Cy3-gekoppeltem Ratte-anti-Maus-ICOS-L monoklonalem Antikörper (Klon: MIL957) und biotinyliertem Maus-IgG Fc Fragment sowie Streptavidin-Alexa 555 angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mittels eines konfokalen Mikroskops analysiert. **A-C:** Einzelne Darstellung der Färbung von ICOS-L (blau), fcr-1/m138 (rot) und MCMV-GFP (grün). **D:** Überlagerung der Färbungen von A-C. **E:** Kontrolle, Färbung uninfizierter Zellen mit den Reagenzien. Das Ergebnis wurde durch ein weiteres unabhängiges Experiment bestätigt.

III.4 Der ICOS-Signalweg ist essenziell für eine effektive Immunantwort gegen eine MCMV-Infektion *in vivo*

Aufgrund der Modulation des ICOS-L durch das MCMV-exprimierte Protein fcr-1/m138 wurde die Bedeutung des ICOS/ICOS-L Systems bei einer MCMV-Infektion untersucht.

III.4.1 ICOS-exprimierende T-Zellen infiltrieren MCMV-infiziertes Gewebe

ICOS wird von aktivierten TZ exprimiert und sein Bindungspartner ICOS-L wird auf einer Vielzahl professioneller und nicht-professioneller APZ exprimiert und ggf. heraufreguliert (Übersichtsartikel: Greenwald, 2005). T-Zellen infiltrieren während einer MCMV-Infektion die befallenen Organe, z. B. die Speicheldrüsen (Cavanaugh *et al.*, 2003).

III.4.1.1 Histologische Analyse von zellulären Infiltraten in den Speicheldrüsen MCMV infizierter Mäuse

Für diese Experimente wurden die überlebenden Tiere aus einer LD_{50} -Bestimmung verwendet. Sie wurden mit $3x10^5$ Pfu MCMV-GFP, Stamm Smith infiziert. Das entsprach einem Zehnfachen der LD_{50} . Zur Kontrolle wurde Mäusen Medium alleine injiziert. Die Speicheldrüsen wurden am Tag 15 nach Infektion entnommen und histologisch nach Zell-Infiltraten untersucht (Abb. 18).

In den Speicheldrüsen infizierter Tiere ist eine deutliche Färbung von CD4⁺- und CD8⁺-TZ, sowie B220⁺-B-Zellen zu erkennen. Die Zellen bilden lokale Anhäufungen. In den uninfizierten Tieren lassen sich diese Infiltrate nicht nachweisen.





III.4.1.2 Analyse der ICOS-Expression von T-Zellen in Speicheldrüse und Milz bei MCMV-Infektion

Zur Untersuchung der ICOS-Expression von T-Zellen in Milz und Speicheldrüsen infizierter Tiere wurden BALB/c WT oder als Kontrolle BALB/c ICOS-KO-Mäuse i. p. mit einer sublethalen Dosis von MCMV-GFP Stamm Smith/Tier infiziert (4,5x10³ Pfu). Die Speicheldrüsen und Milzen wurden zu

verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion entnommen und durch Collagenase und DNAse verdaut. Danach wurden die Zellen vereinzelt, indem das Gewebe durch Siebe gequetscht wurde. Milzzellen wurden anschließend noch durch Erythrozytenlyse aufgereinigt. Die Zellen wurden dann im Durchflusszytometer analysiert. Die TZ wurden anhand ihrer Expression von CD3 und CD4 bzw. CD8 ausgewählt und auf ihre ICOS-Expression hin untersucht.

Die Menge der in die Speicheldrüsen infizierter Tiere eingewanderten T-Zellen war bei ICOS-defizienten und WT-Tieren gleich (nicht gezeigt).

Sowohl in der Milz, als auch in den Speicheldrüsen der WT-Tiere exprimieren CD4⁺-und CD8⁺-T-Zellen im Laufe der Infektion ICOS (Abb. 19). Die ICOS-Expression ist am Tag 8 nach Infektion auf allen Zelltypen und in allen Organen am stärksten. In der Speicheldrüse verändert sich im Laufe der Infektion die Färbehelligkeit der ICOS-Expression der gesamten Zellpopulation. Dadurch verschiebt sich im Histogramm die gesamte Zellpopulation nach rechts. Es exprimieren fast alle infiltrierenden TZ der Speicheldrüse im Laufe der Infektion ICOS, allerdings unterschiedlich stark. In der Milz hingegen ist zu jedem Zeitpunkt eine deutlich ICOS-negative CD4-TZ-Populationen zu erkennen. Verglichen mit der Kontrolle beträgt in der Speicheldrüse der Anteil ICOSexprimierender CD8⁺-Zellen zu diesem Zeitpunkt 36 % und an CD4⁺-TZ-76 %. In der Milz liegt der Anteil bei 28 % der CD8⁺-TZ und 48 % der CD4⁺-TZ. Danach nimmt die ICOS-Expression aller Zellen wieder ab. Dies geschieht auf den CD8⁺-TZ schneller als auf den CD4 TZ. Am Tag 15 exprimieren z.B. in der Speicheldrüse nur noch 7% der CD8⁺-TZ und demgegenüber 70% der CD4⁺-TZ ICOS.

Bei den infiltrierenden TZ muss es sich um aktivierte TZ handeln, da ICOS erst nach primärer Aktivierung der TZ auf der Zelloberfläche heraufreguliert wird (Yoshinaga *et al.*, 1999).



Abb. 19: Analyse der ICOS-Expression von TZ in der Speicheldrüse MCMV-infizierter Mäuse. BALB/c-Mäuse wurden i. p. mit 4,5x10³ Pfu MCMV-GFP, Stamm Smith infiziert. TZ wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion aus der Milz oder Speicheldrüse angereichert und im Durchflusszytometer untersucht. Die TZ wurden anhand ihrer Expression von CD3 und CD4 bzw. CD8 identifiziert. Die ICOS-Expression der TZ-Subtypen ist in den Histogrammen dargestellt (offene Histogramme). Zur Kontrolle der ICOS-Färbung wurden TZ aus BALB/c ICOS-KO-Mäusen verwendet (graue, gefüllte Histogramme). Gezeigt ist je ein Tier von zweien. Das Ergebnis wurde durch weitere Analysen bestätigt.

III.4.2 ICOS-Defizienz führt zu einem Defekt der Viruselimination aus Milz und Speicheldrüse

Die Infektion von WT-Mäusen gliedert sich in eine akute Phase, in der der Virustiter in den befallenen Organen wie Milz und Leber schnell ansteigt, und eine Latenzphase, die meistens lebenslang anhält und während der kein produktiver Virus in den Organen feststellbar ist, sondern lediglich das virale Genom. Diese Kinetik ist in der Speicheldrüse gegenüber den anderen Organen deutlich verzögert. Dort steigt der Virustiter langsamer an, bleibt aber auch mit ca. 35 Tagen länger nachweisbar. Mit ICOS-defizienten Mäusen wurde untersucht, wie sich ein Verlust des ICOS/ICOS-L-Systems auf die Entwicklung der Virustiter bei einer MCMV-Infektion auswirkt.

Dazu wurden ICOS-defiziente BALB/c-Mäuse herangezogen. Die Tiere wurden zum Vergleich mit WT BALB/c-Mäusen i. p. mit einer sublethalen Dosis MCMV-GFP, Stamm Smith infiziert (4,5 x 10³ Pfu/Tier). Die Virustiter in Milzen und Speicheldrüsen wurden danach über einen Zeitraum von bis zu 6 Wochen nach Infektion gemessen (Abb. 20).

Bei MCMV-Infektion entwickelten sich die Titer in den verschiedenen Organen unterschiedlich. In der Speicheldrüse von WT-Tieren steigt der Titer von 0 Pfu/g am Tag 2 auf ein Maximum von ca. 5x10⁶ Pfu/g am Tag 15 nach Infektion langsam an und sinkt dann bis zum Tag 43 wieder unter die Detektionsgrenze (10¹ Pfu/g). Demgegenüber steigt der Titer in der Milz während der ersten 48 h nach Infektion schnell auf den maximalen Wert von 10⁵ Pfu/g an und sinkt dann kontinuierlich bis zum Tag 29 unter die Detektionsgrenze.

Im Vergleich von WT-mit KO-Tieren fällt auf, dass sich die Titer in den Organen von WT- und ICOS-KO-Tieren in den ersten Tagen nach Infektion gleich entwickeln (Tag 0-15 in der Speicheldrüse und Tag 0-8 in der Milz). Auch der maximale Titer in den Organen ist bei WT- und KO-Tieren gleich (Speicheldrüse: ca. 5x10⁶ Pfu/g, Milz: ca. 10⁵ Pfu/g)

Erst in der späten Phase, wenn das Maximum des Titers in den WT-Tieren überschritten wurde, ergibt sich ein deutlicher Unterschied: In der Speicheldrüse von ICOS-defizienten Tieren ist der Titer 29 Tage nach Infektion z.B. gegenüber den WT-Tieren um den Faktor 2000 erhöht (2x10³ vs. 6x10⁶ Pfu/g). In der Milz von WT-Tieren ist zu diesem Zeitpunkt bereits kein produktiver Virus mehr nachweisbar, bei den KO-Tieren liegt er dagegen noch bei 10³. Auch 43 Tage nach Infektion sind in den Organen von 2 von 5 ICOS-defizienten Tieren noch infektiöse Viren nachweisbar, in den Organen von WT-Tieren dagegen nicht.

Die Geschwindigkeit der Elimination von produktivem MCMV aus Milz und Speicheldrüse nach der akuten Phase der Infektion ist somit bei ICOS-Defizienz stark verzögert.



Abb. 20: ICOS-Defizienz führt zu einer verzögerten Eliminierung von produktivem Virus aus infizierten Organen. Die Entwicklung der Virus-Titer in den Speicheldrüsen sowie Milzen von MCMV-infizierten, ICOS-defizienten und WT-Mäusen wurde verglichen. BALB/c-Mäuse wurden i. p. mit 4,5x10³ Pfu/Tier MCMV-GFP Stamm Smith infiziert. Die Virustiter in Milz und Speicheldrüse wurden über einen Zeitraum von 6 Wochen mittels Plaque-Assay auf murinen embryonalen Fibroblasten bestimmt. Das Experiment wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt. Die gemittelten Titer sind durch horizontale Balken dargestellt. Gefüllte Kreise: BALB/c ICOS-KO, gestrichelte Linie: Detektionsgrenze (10 Pfu/g).