

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Derzeitiges Modell der T-Zell-Aktivierung

Die Generierung einer effektiven Immunantwort setzt die Aktivierung und schnelle Expansion von niederfrequenten Antigen-spezifischen T-Zellen und damit die Bildung eines Antigen-spezifischen Gedächtnisses voraus.

Für ihre Aktivierung brauchen T-Zellen Signale über den T-Zell-Rezeptor. Das Signal über den T-Zell-Rezeptor kommt durch Bindung eines spezifischen T-Zell-Rezeptors an Peptide des Antigens im Kontext des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histokompatibility complex*, MHC) auf Antigen-präsentierenden Zellen zustande. Für eine optimale Aktivierung brauchen T-Zellen kostimulatorische Signale über die Interaktion von Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen. Fehlen diese kostimulatorischen Signale, kommt es zu unvollständiger T-Zell-Aktivierung von T-Helfer (Th) -Zellen (Th-Zellen sind CD4<sup>+</sup>) oder zu einem Stadium von T-Zell-Anergie.

Die T-Zell-Aktivierung findet in den sekundär-lymphatischen Organen statt. T-Zellen gelangen mit dem Blutstrom bzw. dem Lymphsystem in die T-Zell-Zone der sekundär-lymphatischen Organe, wo sie ein Signal über den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor und ein kostimulatorisches Signal erhalten. Beide Signale werden von Antigen-präsentierenden Zellen in verschiedenen Teilen der sekundär-lymphatischen Organe geliefert.

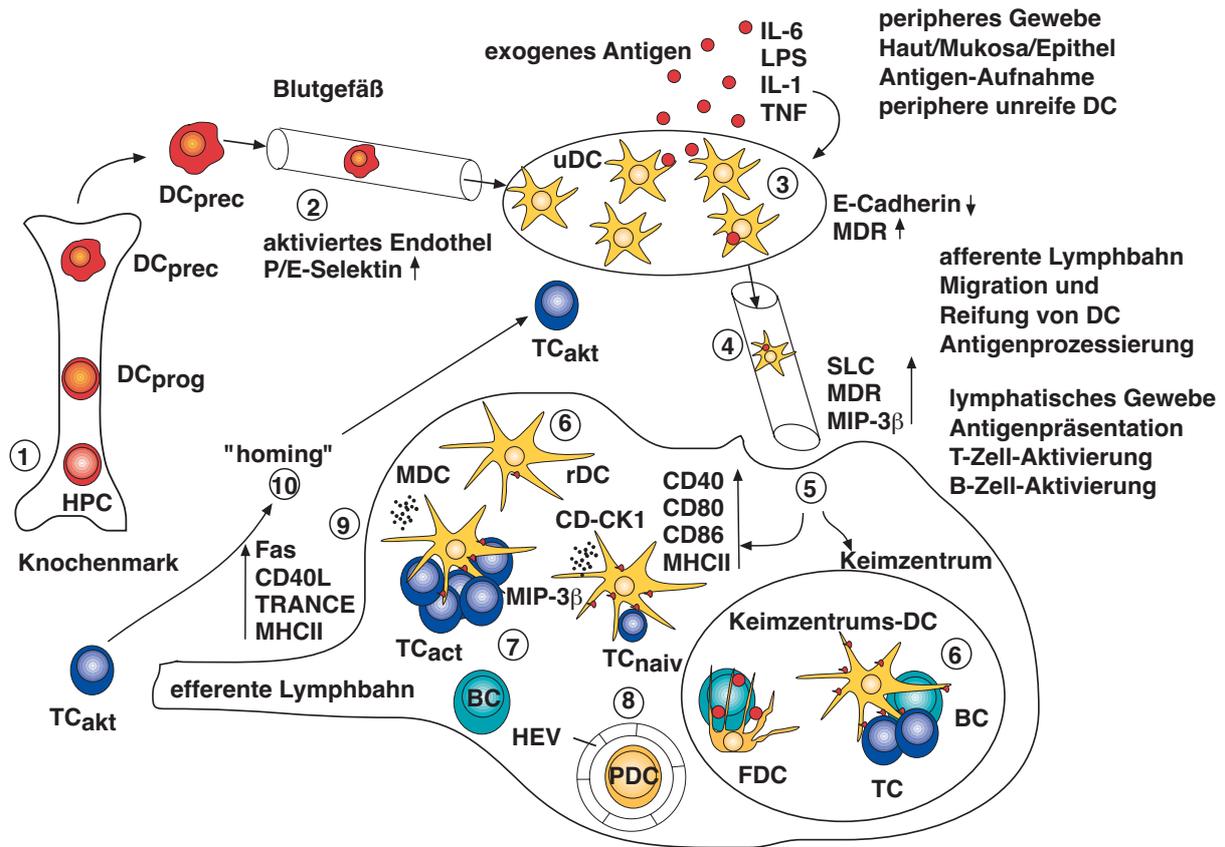
Ein für die T-Zell-Aktivierung außerordentlich wichtiger Zelltyp sind dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC). Dendritische Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen heterogenen Ursprungs, die zunächst auf Grund ihrer Morphologie mit langen zytoplasmatischen Ausläufern, die sie im Laufe ihrer Aktivierung und Reifung ausbilden können, als Gruppe zusammengefaßt werden. Dendritische Zellen kommen in lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen vor und zirkulieren in afferenten Lymphbahnen und im Blut [1]. Dendritische Zellen stellen ein Verbindungsglied zwischen der angeborenen Immunität (phagozytierende Zellen, Natürliche Killerzellen, Komplementfaktoren, Interferone) und der adaptiven Immunität (Rearrangement von Genen der Immunglobulin-Familie und so entstehender großer Diversität Antigen-spezifischer T-Zellen, immunologisches Gedächtnis) dar [2].

Dendritische Zellen nehmen Antigen auf und präsentieren es Antigen-spezifischen T-Zellen. Der Prozess der Antigenaufnahme findet nur in unreifen dendritischen Zellen statt. Unreife dendritische Zellen zeichnen sich u.a. durch das intrazelluläre Vorkommen von Molekülen des MHC und einer

schwachen Expression kostimulatorischer Moleküle aus. Das Vorhandensein kostimulatorischer Moleküle ist für die vollständige Aktivierung der T-Zellen notwendig [1]. Nach Antigenaufnahme durch z. B. Langerhans-Zellen in der Haut wandern die dendritischen Zellen über afferente Lymphbahnen in die T-Zell-Zone der sekundär-lymphatischen Organe, wo sie mit nicht aktivierten Th-Vorläufer-Zellen zusammentreffen. Durch verschiedene koordinierte Aktionen von Chemokinen und ihren Rezeptoren reifen die dendritischen Zellen auf der Wanderung in die sekundär-lymphatischen Organe aus. Die Migration der dendritischen Zellen vom entzündeten Gewebe durch das Endothel in die Lymphbahnen könnte bereits einen wichtigen Stimulus zur finalen Reifung der dendritischen Zellen darstellen [3;4]. *In vivo* durchlaufen dendritische Zellen der Haut, sog. Langerhans-Zellen, unter dem Einfluß verschiedener von Keratinozyten und anderen Zellen sezernierten Zytokinen eine Reihe phänotypischer und funktioneller Veränderungen auf der Wanderung in die sekundär-lymphatischen Organe [5] (Abb. 1).

Reife dendritische Zellen sind durch die hohe Expression von Molekülen des MHC und kostimulatorischen Molekülen gekennzeichnet [1] und können das aufgenommene Antigen im Kontext des MHC den antigenspezifischen T-Zellen präsentieren. Reife dendritische Zellen liefern auch das zur vollständigen T-Zell-Aktivierung nötige kostimulatorische Signal, u.a. über Moleküle der B7-Familie (u. a. CD80 und CD86) [6].

Einige der in der T-Zell-Zone und im Keimzentrum aktivierten T-Zellen werden zu Gedächtnis-T-Zellen, was eine schnelle und effektive Antwort erlaubt, wenn ein Antigen erneut in den Organismus eindringt. Ein erneuter Kontakt der T-Zellen mit dem Antigen kann auch als Restimulation der T-Zellen bezeichnet werden. T-Zellen sezernieren Zytokine und exprimieren Oberflächenmoleküle, die B-Zellen zur Expansion und Antikörperproduktion anregen (auch als T-Zell-Hilfe für B-Zellen bezeichnet). Die Genese, Wanderung und Reifung von dendritischen Zellen ist in Abb. 1 zusammengefaßt.



**Abb. 1: Dendritische Zellen im Immunsystem.** DC Vorläufer, DC precursor und DC progenitor, gehen aus Hematopoetischen Pluripotenten Zellen (*hematopoietic stem cells*, HPC) des Knochenmarks hervor. DC precursor entwickeln sich sowohl zu monozytären DC-Vorläufern als auch zu plasmazytoiden DC-Vorläufern (1). Aktivierte Endothelzellen erleichtern durch Adhäsionsmoleküle (P/E-Selektin) das Ein- und Auswandern der DC vom Blut in die Peripherie (2). Bei der Aufnahme von Antigen durch unreife DC (z. B. Langerhans-Zellen in der Haut) in peripheres Gewebe spielen bakterielle Produkte (z. B. LPS) und frühe proinflammatorische von Keratinozyten sezernierte Zytokine (IL-1, IL-6, TNF) eine Rolle bei der Differenzierung von DC-Vorläufern und bei der Aktivierung der unreifen DC [5]. Unreife DC regulieren Adhäsionsmoleküle herunter (E-Cadherin) und wandern zu den Lymphgefäßen. Bewegung und Orientierung erfolgt durch verstärkte Regulation von MDR (*multi drug resistant protein*), Integrinen und Chemokinrezeptoren (3). Gleichzeitig exprimieren Zellen der lymphatischen Bahnen verstärkt Adhäsionsmoleküle und SLC (*secondary lymphoid tissue chemokine*) (4). In den lymphatischen Organen bewegen sich die Zellen entweder in die Keimzentrumsfollikel oder in die T-Zell-Zone der sekundär-lymphatischen Organe (5). Die durch die Migration gereiften DC exprimieren verstärkt kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) und auch Antigen-MHCII-Komplexe (6). Im Keimzentrum wird außerdem natives Antigen von Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) den Plasma-B-Zellen präsentiert, die zu Ak-produzierenden B-Zellen reifen (6). Durch die Produktion von Chemokinen (MIP, *macrophage inflammatory protein-3β*) werden T-Zellen angelockt (DC-CK1 wirkt als Chemokin auf naive T-Zellen, MDC (*macrophage derived chemokine*) wirkt auf aktivierte T-Zellen), so daß erste enge Kontakte mit Antigen-spezifischen T-Zellen (*priming*) ermöglicht werden (7). Wenn es sich um virales Antigen handelt, sind vermutlich durch HEV (*high endothelial venules*) einwandernde plasmazytoide DC involviert (8). Das Schicksal der DC nach Kontakt mit T-Zellen und nach Antigenpräsentation ist ungeklärt. Vermutlich begehen die seneszenten DC Apoptose durch enge Aggregatbildung mit FasL-exprimierenden T-Zellen und der Interaktion von Fas, CD40L und TRANCE, beim Prozess der Apoptose involvierte Moleküle (9). Aktivierte T-Zellen (Effektor-T-Zellen) verlassen durch die efferenten Lymphbahnen die sekundär-lymphatischen Organe und rezirkulieren durch Blut und Gewebe. Einige T-Zellen kehren zum Ort der initialen Antigenaufnahme durch die DC zurück (*homing*) (10) [7].

## 1.2 Regulation von Immunantworten durch Th1- und Th2-Zell Subpopulationen

CD4<sup>+</sup> Th-Zellen können zu unterschiedlichen Effektorpopulationen differenzieren, die charakterisiert sind durch das Profil der sezernierten Zytokine und die Expression von Oberflächenmolekülen.

Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden nach Aktivierung zu Th0-Effektor-Zellen und differenzieren abhängig von der Art der Immunantwort zu Th1- oder Th2-Effektor-Zellen. Die Produktion von Th1-Zellen führt i. a. zu einer Zell-vermittelten Immunität (Makrophagen, Natürliche Killerzellen, zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen), während Th2-Zellen eine humorale Immunantwort hervorbringen. So werden z. B. im Zuge einer Immunantwort auf infektiöse Agenzien, einigen Bakterien und Viren Th1-Zellen gebildet und als Reaktion auf Helminthen-Infektionen und Allergene vermehrt Th2-Zellen. Th1-Zellen sind charakterisiert durch die Sekretion der Zytokine Interferon (IFN)- $\gamma$  und Interleukin (IL)-2, während Th2-Zellen vor allem IL-4, IL-5 und IL-10 freisetzen. Die von Th1- bzw. Th2-Zellen gebildeten Zytokine haben unterschiedliche Wirkungen auf andere Zellen des Immunsystems [8;9].

## 1.3 Modulation der Immunantwort durch Subpopulationen von dendritischen Zellen

### 1.3.1 Polarisierung von Th1- versus Th2-Zellen durch dendritische Zellen

Subtypen von dendritischen Zellen können Signale liefern, welche die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th1- versus Th2-Zellen während einer Immunantwort determinieren [2]. Es wird angenommen, daß CD11c<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup> dendritische Zellen sich entsprechend aus einer myeloiden bzw. lymphoiden Vorläufer-Zelle entwickeln. Lymphoide und myeloide Vorläufer gehen beide aus einer CD34<sup>+</sup> hematopoetischen Stammzelle hervor.

CD11c<sup>+</sup> myeloide dendritische Zellen polarisieren naive T-Zellen vorwiegend in Richtung eines Th1-Typs und werden auf Grund ihrer Th1-induzierenden Eigenschaften als DC1-Zellen bezeichnet. Die Th1-induzierenden Eigenschaften myeloider dendritischer Zellen sind nicht statisch. So wird in zahlreichen Arbeiten behauptet, daß myeloide dendritische Zellen durch das sie umgebende Zytokinmilieu in ihren Induktionseigenschaften beeinflußt und in Th2-induzierende dendritische Zellen umgewandelt werden können, wenn sie mit anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ , mit Steroiden [10] oder auch mit Prostaglandinen behandelt werden [11-15].

Mit Prostaglandinen ausgereifte humane dendritische Zellen sollen die Produktion von großen Mengen IL-4 und geringen Mengen IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* bewirken [14].

Plasmazytoide dendritische Zellen sind CD11c<sup>-</sup> lymphoide dendritische Zellen und zeichnen sich durch die Produktion von Interferonen in Reaktion auf virale Stimuli aus [16]. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, daß sie ein Th2-Zytokinprofil in naiven T-Zellen hervorrufen können und deswegen werden sie auch als DC2-Zellen bezeichnet [17]. Das Ausmaß der T-Zell-Polarisierung durch CD11c<sup>-</sup> dendritische Zellen scheint abhängig vom Differenzierungs- und Reifungsstadium der dendritischen Zellen zu sein. CD11c<sup>-</sup> Vorläufer-Zellen rufen eher ein Th0-Zytokinprofil hervor, während nach Reifung der plasmazytoiden dendritischen Zellen Th2-Zellen induziert werden [18]. Das Muster der in T-Zellen induzierten Zytokine ist auch abhängig von der durch die dendritischen Zellen sezernierten Menge an IL-12 [17].

### 1.3.2 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch dendritische Zellen

Interessanterweise sind Subpopulationen von dendritischen Zellen nicht nur an der Aktivierung von T-Zellen bei der Immunantwort gegen Fremdanitigen beteiligt, sondern spielen ebenso eine Rolle bei der Toleranz gegen Selbstantigene durch Induktion regulatorischer T-Zellen.

Diese Subpopulationen von dendritischen Zellen können Toleranz gegen lösliche Antigene [19], virale Antigene [20], Tumoren [21] und Antigene aus Transplantaten induzieren [22]. Unklar ist, ob die Fähigkeit zur Toleranzinduktion auf spezielle regulatorische Subtypen dendritischer Zellen beschränkt ist [23-25], oder ob die Toleranzinduktion vom Reifungsmodus der dendritischen Zellen abhängig ist [26]. Unreife dendritische Zellen könnten eine Toleranz-induzierende Wirkung durch Apoptoseinduktion in T-Zellen, durch Auslösen von Anergie oder durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen haben [27].

## 1.4 Kostimulatorische Moleküle auf T-Zellen: CD28 und CTLA-4

CD28 und CTLA-4 (s. Abb. 2) sind Glykoproteine der Immunglobulin-Superfamilie und werden von T-Zellen als Homodimere exprimiert [28].

Die Bedeutung kostimulatorischer Signale für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung wurde mit der Entdeckung von CD28 erstmals deutlich [29;30]. CD28 ist ein positiv kostimulatorisches Molekül, definiert über die Fähigkeit, die Aktivierung von T-Zellen in Anwesenheit eines Signals über den T-Zell-Rezeptor zu erhöhen [31].

Mehr als 80% der humanen T-Zellen (nahezu alle CD4<sup>+</sup> und ca. 50-80% der CD8<sup>+</sup>) exprimieren konstitutiv CD28. Die Expression von CD28 wird nach Aktivierung der T-Zellen noch weiter erhöht [32].

Signale über CD28 sind nötig für die Produktion von IL-2 durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Expression des IL-2 Rezeptors und die Zell-Zyklus-Progression von T-Zellen [33-35]. *In vitro* zeigen T-Zellen CD28-defizienter Mäuse eine Einschränkung der Proliferation nach Stimulation mit Ak gegen CD3, Allostimulation und eingeschränkte Antigen-spezifische T-Zell-Antworten [36;37]. *In vivo* zeigt sich die Bedeutung des CD28 Signalwegs durch eingeschränkte T-Zell-Hilfe für B-Zellen bei CD28-defizienten Mäusen [37]. CD28-Defizienz führt außerdem zu einem weniger schweren Verlauf von Arthritis [38], einem abgeschwächten Verlauf von experimenteller allergischer Encephalomyelitis (EAE) [39] und Lungenentzündung [40].

CTLA-4 wurde als zweites Molekül der CD28-Familie kloniert [41]. CTLA-4 liefert ein negatives Signal an zuvor aktivierte T-Zellen und wird als Gegenspieler der CD28 vermittelten Kostimulation betrachtet [42].

Auf humanen und murinen T-Zellen ist CTLA-4 im Gegensatz zu CD28 nicht konstitutiv exprimiert, sondern wird im Zuge der T-Zell-Aktivierung verstärkt. Die Expression ist nach 48 h maximal und geht nach 96 h auf ein niedriges Niveau zurück [41-43].

Die *in vivo*-Bedeutung des CTLA-4-Signalwegs zeigt sich bei einer CTLA-4-defizienten Maus, die durch überschießende lymphoproliferative Defekte wie polyklonale T-Zell-Aktivierung und hochfrequent vorkommende T-Zellen mit Aktivierungs- und Gedächtnis- T-Zell-Antigenen auffällt [44]. Neuere Daten zeigen, daß CTLA-4 ein wichtiges Signal zur T-Zell-Toleranz setzt [45].

Die Bindung von CD28 scheint für die Expression von CTLA-4 notwendige Signale zu liefern. Aktivierte CD28-defiziente T-Zellen aus der Maus exprimieren kein CTLA-4 auf der Oberfläche [42].

### **1.5 Liganden für CD28 und CTLA-4: CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen**

Die Liganden von CD28 und CTLA-4 sind CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), wobei sowohl CD28 als auch CTLA-4 an beide Liganden binden kann (s. Abb. 2).

CD80 ist auf aktivierten B-Zellen und einer Reihe anderer Antigen-präsentierender Zellen wie dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen und aktivierten Monozyten, aber gering auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert [28]. CD86 wird bereits von ruhenden B-Zellen exprimiert, aber nach Aktivierung nochmals heraufreguliert. Unterschiede gibt es in der Kinetik von CD80 im Vergleich zur CD86 Expression. CD86 ist bereits nach 6 h Stimulation, CD80 dagegen erst nach 48-72 h maximal auf der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert [28]. Die Induktion von CD80 und CD86 scheint stark abhängig vom CD40/CD40L Signalweg zu sein. Beide Moleküle werden über CD40 induziert [46;47].

Der Unterschied in der Induzierbarkeit und die unterschiedliche Kinetik von CD80 und CD86 führte zu der Hypothese, daß die Interaktion von CD86 mit CD28 für die initiale T-Zell-Kostimulation und die Interaktion von CD80 mit CD28 für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung entscheidend ist [6].

CD80 und CD86 sind Glykoproteine der Immunglobulin-Superfamilie. Die B7-Moleküle bilden nicht kovalent verbundene Homodimere mit einer Ig-Domäne vom konstanten und variablen Typ [48;49].

## 1.6 Neue Mitglieder der B7-Familie und der CD28-Familie

Das Bild der kostimulatorischen Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen wurde mit der Identifizierung von vier neuen Mitgliedern der B7-Familie komplexer.

Tab. I zeigt eine Übersicht der Moleküle der B7-Familie und der Liganden.

Tab. I: Übersicht der B7-Moleküle

<b>B7-Familien Mitglied</b>	<b>Ligand</b>	<b>Andere Namen</b>
B7-1 [50;51]	CD28/CTLA-4	BB1, B7, CD80
B7-2 [52]	CD28/CTLA-4	CD86
ICOS-L [53-60]	ICOS	B7h, GL-50, B7RP-1, LICOS, B7-H2
PD-L1 [61]	PD-1	B7-H1
PD-L2 [61]	PD-1	B7-DC
B7-H3 [62]	unbekannt	B7RP-2

Interessanterweise werden diese Moleküle auf verschiedenen Zelltypen exprimiert und nach Aktivierung unterschiedlich reguliert, wie mRNA Analysen ergeben haben [6]. Die Funktion der in Tab. I aufgelisteten Moleküle ist noch nicht vollständig verstanden, doch gibt es starke Hinweise, daß sie entscheidenden Einfluß auf die Differenzierung von aktivierten T-Zellen haben.

### 1.6.1 ICOS

ICOS (*Inducible Co-Stimulator*) wurde 1999 in unserem Labor identifiziert und kloniert und ist das dritte Mitglied der CD28-Familie (s. Abb. 2) [63]. Im Gegensatz zur konstitutiven CD28 Expression wird ICOS abhängig vom Stimulus innerhalb von 6 bis 48 h auf T-Zellen des humanen peripheren Bluts induziert und ist auf fast allen CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen in der Tonsille vorhanden [63]. *In vitro* ist ICOS auf T-Zellen aus der Milz der Maus ähnlich wie auf humanen T-Zellen innerhalb von 12 bis 48 h induzierbar. ICOS liefert ein kostimulatorisches Signal an T-Zellen und erhöht die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion und Zytokinsekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen [53;63;64].

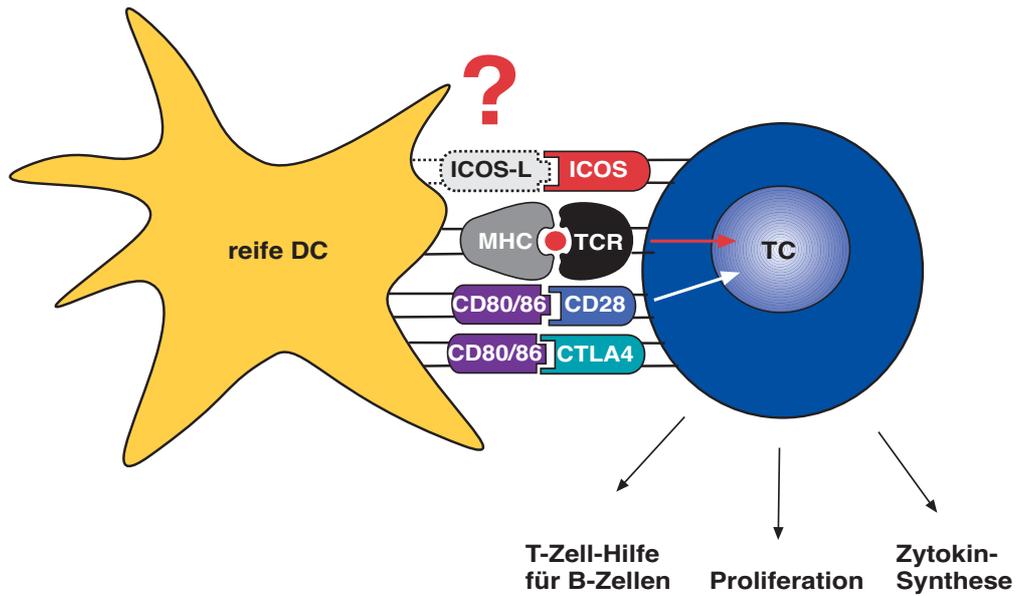
ICOS wurde immunhistologisch in der Medulla des Thymus, den Keimzentren und T-Zell-Zonen von Lymphknoten, Tonsillen und Peyers Patches detektiert [56;63;65].

### 1.6.2 ICOS-L

Besonderes Interesse gilt in dieser Arbeit dem Liganden zu ICOS, ICOS-Ligand (ICOS-L). ICOS-L wird auch als B7h [57], B7RP-1 [55], GL50 [58], B7-H2 [59] und LICOS [60] bezeichnet (Tab. 1). ICOS-L ist auf Proteinebene 20% homolog zu CD80 und CD86. Im Vergleich dazu sind CD80 und CD86 untereinander zu 25% homolog. 13 der 32 Aminosäuren, die verantwortlich sind für die IgV und IgC ähnliche Faltung, sind konserviert. ICOS-L fehlt jedoch das SQDELY Motiv, so daß ICOS-L nicht an CD28 und CTLA-4 binden kann. Experimentell wurde gezeigt, daß ICOS-L-Fusionsprotein an eine ICOS-Transfektante, nicht jedoch an eine CD28 Transfektante bindet [53;65].

Im humanen System ist ICOS-L schwach auf Monozyten exprimiert und wurde ebenfalls auf Monozyten-generierten dendritischen Zellen detektiert (Ergebnisse dieser Arbeit, s. a. Abb. 2) [54;59]. Ruhende B-Zellen des peripheren Blutes exprimieren ICOS-L konstitutiv und CD3<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren schwach ICOS-L (Yoshinaga, Int. Immunol., 2000) [55].

Im murinen System ist ICOS-L konstitutiv auf B-Zellen und Makrophagen exprimiert [53;55;57;59]. *In situ*-Hybridisierungs-Analysen zeigten eine starke Expression von ICOS-L in B-Zell-Follikeln von Peyers Patches, Tonsillen und Lymphknoten und in Thymi normaler Tiere [53]. Mäuse, transgen für ICOS-L, entwickeln eine T-Zell-Hyperplasie, Plasmazytose und eine Hypergammaglobulinämie. Außerdem erhöht die Zugabe von ICOS-L-Fusionsprotein die Effektorantwort während einer kutanen Hypersensitivitätsreaktion [53].



**Abb. 2: Reife dendritische Zellen initiieren und unterhalten die Immunantwort durch Stimulation von  $CD4^+$  T-Zellen.** Reife dendritische Zellen stimulieren T-Zellen über die Bindung eines antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors mit Molekülen des MHC Klasse II (MHCII). Dieser Prozeß ist von der Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle wie CD28, CTLA-4 und ICOS abhängig. Signale sowohl über den T-Zell-Rezeptor und als auch über die kostimulatorischen Moleküle führen zu einer Aktivierung der T-Zellen. Aktivierung führt i. a. zu Proliferation, Zytokinsynthese und T-Zell-Hilfe für B-Zellen.

## 1.7 Modulation der Immunantwort durch kostimulatorische Moleküle

Während der T-Zell-Aktivierung werden CD80 und CD86 unterschiedlich exprimiert und reguliert. So werden T-Zellen durch Bindung von CD28 (konstitutiv auf T-Zellen exprimiert) an die Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) zu Proliferation und IL-2 Synthese angeregt, während CTLA-4 erst nach Heraufregulation diesen Vorgängen entgegenwirken kann. Die Affinitäten der Moleküle CD80 bzw. CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen zu CD28 bzw. CTLA-4 auf T-Zellen spielen bei der Koordination dieser Vorgänge eine entscheidende Rolle. Die Affinität von CD80 zu CTLA-4 ist am höchsten, beide Moleküle müssen jedoch im Zuge einer Immunantwort erst induziert werden [6]. CD80 und CD86 liefern ein zeitlich frühes kostimulatorisches Signal an T-Zellen und aktivieren sie auf diese Weise ein erstes Mal. Ein kontinuierlicher Strom Antigen-beladener dendritischer Zellen ist nötig, um T-Zell-Rezeptor-Ligation und B7-Kostimulation zu garantieren [66]. Dieser Vorgang findet in der T-Zell-Zone der sekundär-lymphatischen Organe statt.

Anschließend wandern die T-Zellen in die B-Zell-Follikel der Keimzentren ein und treffen dort als Antigen-spezifische T-Zellen auf Antigen-präsentierende B-Zellen, die sie durch Zytokinsekretion zur Antikörperproduktion anregen. T-Zellen müssen also über ihre erste Aktivierung in der T-Zell-Zone hinaus Signale erhalten, die eine kontinuierliche Aktivierung garantieren. ICOS-L könnte das kostimulatorische Signal im Prozeß kontinuierlicher T-Zell-Aktivierung liefern. ICOS-L exprimierende dendritische Zellen kommen als Partner für aktivierte ICOS exprimierende T-Zellen in Frage, da dendritische Zellen sowohl in der T-Zell-Zone als auch im Keimzentrum vertreten sind.

## 1.8 AUFGABENSTELLUNG

Histologische Befunde zeigten, daß ICOS unter anderem in der T-Zell-Zone von sekundär-lymphatischen Organen exprimiert wird. In dieser Zone stehen T-Zellen in engem Kontakt mit dendritischen Zellen, so daß eine Interaktion von T-Zellen und dendritischen Zellen über das Molekülpaar ICOS/ICOS-L wahrscheinlich ist. Zudem gab es erste Vorbefunde, daß ICOS-L auf dendritischen Zellen exprimiert wird (s. auch Abb. 2). Aufgrund dieses Sachverhalts sollte das Molekülpaar ICOS/ICOS-L in der Interaktion von T-Zellen und dendritischen Zellen phänotypisch und funktionell untersucht werden.

### **1. Etablierung der Kultur zur Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten als Modell für dendritische Zellen *ex vivo***

Als Grundvoraussetzung für die Untersuchung des Molekülpaars ICOS/ICOS-L in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen mußte eine geeignete Technik zur Gewinnung von dendritischen Zellen etabliert werden. Dendritische Zellen sollten aus Monozyten des peripheren Bluts generiert werden.

### **2. ICOS-L Expression auf nativen Subpopulationen dendritischer Zellen**

Im Vergleich zu Monozyten-generierten dendritischen Zellen sollten *ex vivo* isolierte dendritische Zellen auf die Expression von ICOS-L und andere Liganden kostimulatorischer Moleküle untersucht werden. So sollte die Oberfläche von Langerhans-Zellen aus der humanen Haut auf ICOS-L und CD80-CD86 untersucht werden.

### **3. Etablierung von Kokulturen von T-Zellen mit dendritischen Zellen**

Es sollte die Regulation und Funktion der Moleküle ICOS und ICOS-L in der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen untersucht werden. Hierfür war die Etablierung von Kokulturen von dendritischen Zellen mit T-Zellen notwendig.

#### **4. Generierung von DC2-Zellen**

Es sollte überprüft werden, ob CD11c<sup>+</sup> Monozyten-generierte dendritische Zellen durch verschiedene Reifungsprotokolle die Produktion von Th2-Zytokinen in kokultivierten T-Zellen bewirken können.

#### **5. Induktionsbedingungen für die Expression von ICOS auf T-Zellen**

Von Interesse waren die Induktionsbedingungen und das Expressionsniveau von ICOS auf T-Zellen während der Interaktion mit dendritischen Zellen. Auch sollte die Kinetik der ICOS-Expression während der T-Zell-Aktivierung analysiert werden.

#### **6. Induktionsbedingungen für die Expression von ICOS-L auf dendritischen Zellen**

Es sollte die Expression von ICOS-L während der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen *in vitro* untersucht werden.

Insbesondere sollte die Expression von ICOS-L mit anderen Molekülen der B7-Familie auf dendritischen Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Reifungsstimulantien (Zytokine, Entzündungsmediatoren, synthetische RNA, bakterielle Komponenten, CD40-Stimulation) verglichen werden. Für diese phänotypischen Untersuchungen waren durchflußzytometrische Analysen geplant.

#### **7. Funktionelle Untersuchung der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Kokultur von T-Zellen mit dendritischen Zellen**

Es sollte die Beteiligung der kostimulatorischen Signalwege ICOS/ICOS-L im Vergleich zu CD28/CD80-CD86 an der Zytokinfreisetzung in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen untersucht werden. Hierfür war die selektive Blockade dieser Molekülpaare notwendig. Die Blockade sollte durch lösliche Fusionsproteine oder durch mAk geschehen.