

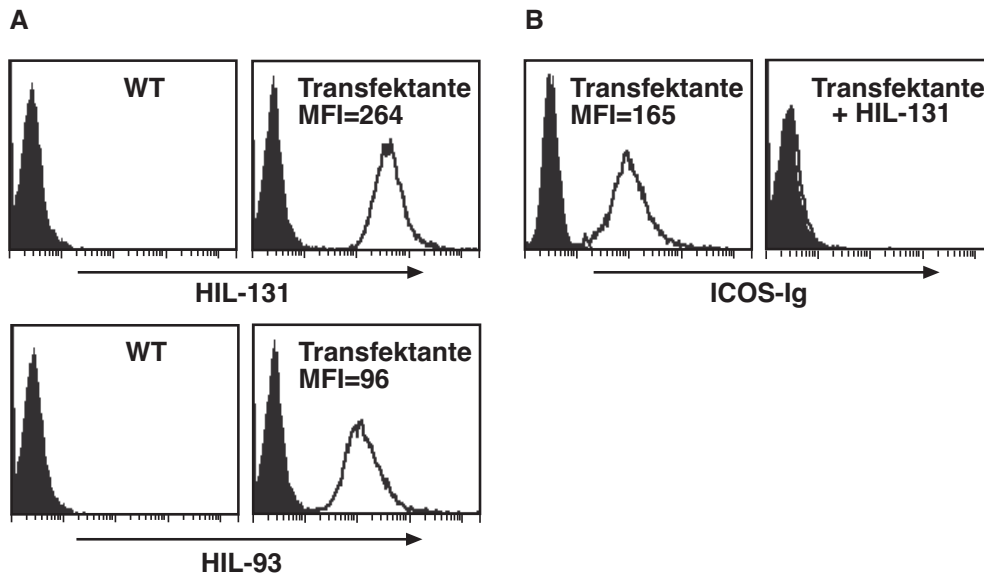
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression von ICOS-L und anderen Oberflächenantigenen auf Monozyten-generierten dendritischen Zellen

##### 3.1.1 Sensitivität der Reagenzien zur Detektion von ICOS-L und Blockadefähigkeit eines monoklonalen Antikörpers gegen ICOS-L

Zur Analyse der Expression und Funktion von ICOS-L wurden verschiedene monoklonale Antikörper (mAk) und Fusionsproteine gegen ICOS-L in unserer Arbeitsgruppe generiert [56;75]. Um die Spezifität der erhaltenen mAks und Fusionsproteine zu prüfen, wurde ICOS-L mit einem PE-gekoppelten Fusionsprotein murin ICOS-human IgG1 und vergleichend mit den mAk HIL-131 und HIL-93 auf einer human ICOS-L transfizierten murinen Fibroblasten-Zelllinie (L-Zellen) [56] in der Durchflußzytometrie analysiert. Das gegen murin ICOS-L gerichtete Fusionsprotein murin ICOS-human Ig kreuzreagiert mit human ICOS-L. Abb. 3A zeigt das Reaktionsmuster von zwei der generierten Ak gegen ICOS-L. Mit allen getesteten Reagenzien wurde eine helle Färbung von ICOS-L auf der Transfektante erreicht. Auf Wildtyp (WT) L-Zellen wurde ICOS-L nicht detektiert. Die Färbung von ICOS-L mit dem PE-gekoppelten Fusionsprotein murin ICOS-human Ig ergab im Vergleich zum mAk HIL-131 auf der Transfektante ein schwächeres Signal (Abb. 3B). ICOS-L konnte mit dem Fusionsprotein auf WT L-Zellen nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Die Färbeintensität von ICOS-L mit dem mAk HIL-93 lag niedriger als die des Fusionsproteins (Abb. 3A).

Um funktionelle Analysen der Interaktion von ICOS und ICOS-L in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen durchführen zu können, wurde ein blockierender Ak benötigt. Abb. 3B zeigt die Fähigkeit des mAk HIL-131, die Bindung von ICOS an seinen Liganden zu verhindern. Vorinkubation der ICOS-L Transfektante mit einem Überschuß des ungekoppelten mAk HIL-131 führte zu einer vollständigen Blockade der anschließenden Färbung mit dem PE-gekoppelten Fusionsprotein. Der mAk HIL-131 erkennt also dasselbe Epitop wie ICOS, der natürliche Bindungspartner.

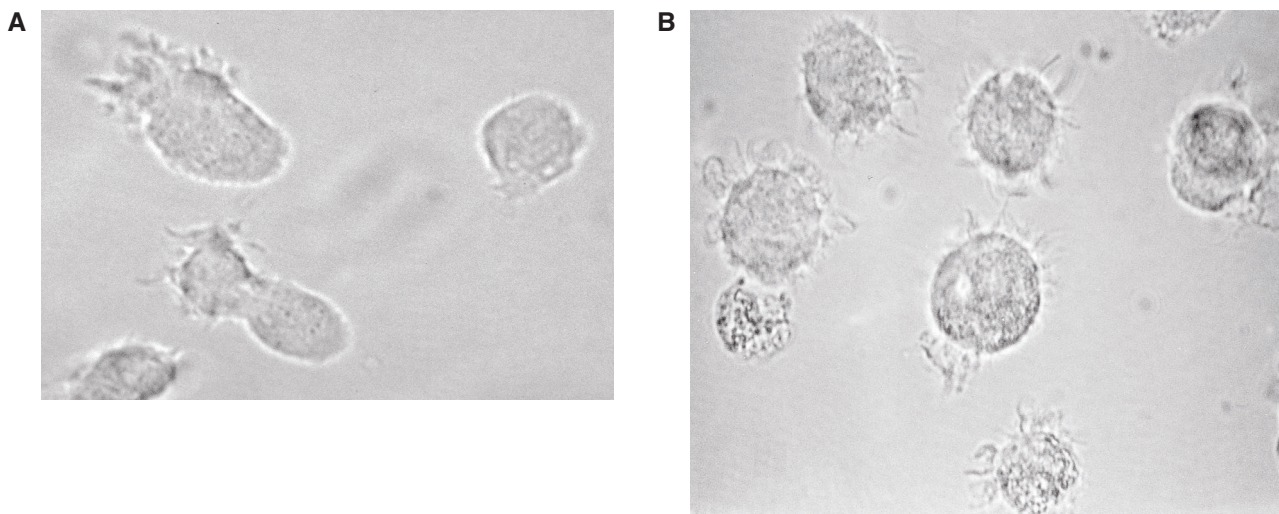


**Abb. 3: Charakterisierung von ICOS-L spezifischen mAk.** (A) WT und ICOS-L transfizierte L-Zellen wurden mit den PE-gekoppelten mAk HIL-131 oder mAk HIL-93 (offene Kurven) gefärbt, die schwarzen Kurven repräsentieren die Isotypkontrolle. (B) Gezeigt wird die Blockadefähigkeit von mAk HIL-131. ICOS-L transfizierte L-Zellen wurden mit einem PE-gekoppelten human ICOS-Kaninchen Ig Fusionsprotein (offene Kurven) oder einem Kontroll-Fusionsprotein (CD3 $\delta$ -Kaninchen Ig, Isotyp, schwarze Kurven) gefärbt. Die Vorinkubation der Zellen mit mAk HIL-131 mit 10  $\mu$ g/ml blockierte vollständig die Färbung mit dem human ICOS-Kaninchen Ig.

In der folgenden Darstellung der ICOS-L Expression auf dendritischen Zellen wurde für einen großen Teil der Analysen in der Durchflußzytometrie das PE-gekoppelte Fusionsprotein verwendet, da dieses Reagenz zuerst verfügbar war. Es ist jedoch wichtig zu beachten, daß die Färbung mit dem mAk HIL-131 zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal führt als die Färbung mit dem Fusionsprotein.

### 3.1.2 Etablierung der Kultur von aus Monozyten generierten dendritischen Zellen

Zur Analyse der ICOS-L Expression auf dendritischen Zellen und zur Untersuchung der Funktion des Molekülpaars ICOS/ICOS-L in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen war eine standardisierte *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen als Modell für *in vivo* vorkommende dendritische Zellen notwendig. Die hierfür gängige Methode wurde für diese Arbeit in unserem Labor etabliert. Monozyten des peripheren Blutes wurden über einen Adhärenzschritt auf Plastik von den übrigen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) getrennt und mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF differenziert. Die so erhaltenen unreifen dendritischen Zellen zeigten am Tag 6 eine charakteristische Morphologie. Die Zellen waren nicht mehr adhärent, es bildeten sich wie erwartet die für unreife dendritische Zellen typischen zytoplasmatischen Ausläufer auf nur einer Seite (Abb. 4A). Ausreifen der Zellkulturen ab Tag 6 für 48 h mit einer Kombination verschiedener Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  [83], führte zu einer verstärkten Bildung von Dendriten (Abb. 4B).

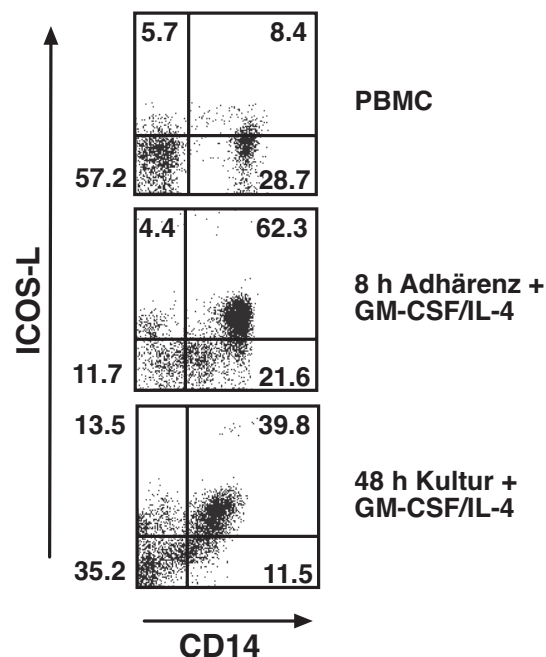


**Abb. 4: Monozyten-generierte dendritische Zellen zeigen eine charakteristische Morphologie mit einem reifen und einem unreifen Stadium.** Durch Plastikadhärenz isolierte CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden mit IL-4 und GM-CSF bis Tag 7 zu unreifen dendritischen Zellen generiert (A). Sie zeigten im unreifen Stadium eine typische birnenförmige Morphologie mit zytoplasmatischen Ausläufern auf nur einer Seite. Die nach Stimulation mit einer Kombination proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  gewonnenen reifen dendritischen Zellen bildeten einen runden Habitus aus mit über die gesamte Zelle verteilten Dendriten (B). Die Vergrößerung ist 1000  $\times$ . Die Aufnahme erfolgte in einer Flüssigkultur durch ein Phasenkontrastmikroskop.

### 3.1.3 Monozyten und dendritische Zellen exprimieren ICOS-L

Monozyten und dendritische Zellen können von anderen Zellen des peripheren Bluts durch die Expression von CD14 abgegrenzt werden.

Abb. 5 zeigt CD14<sup>+</sup> Monozyten aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts. Die Zellen wurden entweder direkt nach Isolierung der PBMC, oder aber nach der Adhärenz auf einer Plastikoberfläche in der Durchflußzytometrie zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. CD14<sup>+</sup> Monozyten exprimierten ICOS-L in einem geringen Maß, wie die Doppelfärbung in Abb. 5 zeigt. Nach 8 h Adhärenz auf Plastik in Anwesenheit der für die Generierung von dendritischen Zellen notwendigen Zytokine IL-4 und GM-CSF nahm die Expression von ICOS-L zu, während der monozytenspezifische Marker CD14 weiterhin exprimiert wurde. Nach 48 h begannen die nicht mehr adhärennten Zellen CD14 herunterzuregulieren.

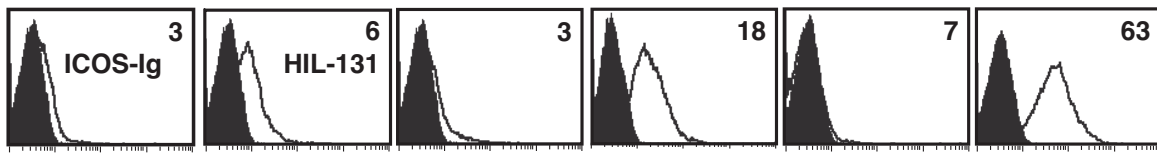
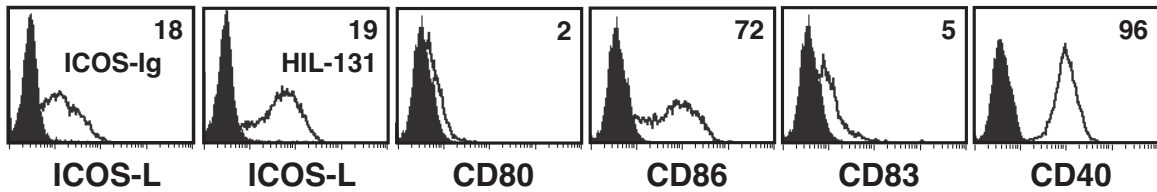


**Abb. 5: Oberflächenexpression von ICOS-L auf Monozyten und unreifen dendritischen Zellen.**

Die Oberflächenexpression von ICOS-L und CD14 wurde auf unstimulierten und kultivierten Monozyten des humanen peripheren Bluts mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Dargestellt ist die Färbung von ICOS-L gegen CD14 auf Monozyten direkt nach Isolierung der PBMC, nach 8 h Adhärenz auf Plastik und nach 48 h Kultur in IL-4 und GM-CSF-haltigem Medium. ICOS-L wurde mit dem PE-gekoppelten Fusionsprotein murin ICOS-human Ig, CD14 mit einem FITC-gekoppelten mAk gefärbt. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der gesamten PBMC an. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt 3.

### 3.1.4 *Ex vivo* isolierte Langerhans-Zellen exprimieren ICOS-L vergleichbar zu *in vitro* generierten dendritischen Zellen

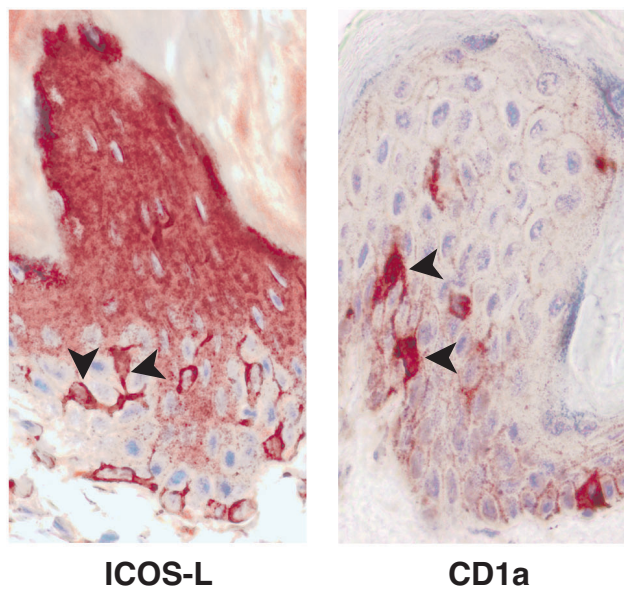
Unreife Monozyten-generierte dendritische Zellen sind mit unreifen Langerhans-Zellen aus der Haut vergleichbar. Langerhans-Zellen gehen wie Monozyten aus einer myeloiden Vorläuferzelle hervor. Abb. 6 zeigt den Vergleich von Oberflächenmolekülen von *in vitro* aus Monozyten generierten dendritischen Zellen mit *ex vivo* isolierten Langerhans-Zellen aus humaner Haut in der Durchflußzytometrie. Die Färbung von ICOS-L auf beiden Zelltypen ist sowohl mit dem Fusionsprotein murin ICOS-human Ig als auch mit dem mAk HIL-131 dargestellt. Die Färbung von ICOS-L war mit dem Fusionsprotein wesentlich schwächer als mit dem mAk HIL-131. Die Expression von ICOS-L war sowohl auf Monozyten-generierten dendritischen Zellen als auch auf Langerhans-Zellen mit beiden Reagenzien nachweisbar, ist jedoch auf den unreifen Langerhans-Zellen schwächer. Langerhans-Zellen werden als unreife dendritische Zellen betrachtet [84]. Eine sehr ähnliche Expression ergab sich für CD80 und CD86, den Liganden für CD28 und CTLA-4. CD80 wurde von beiden Zellen wenig, CD86 stärker exprimiert. Die Expression von CD83 war bei Monozyten-generierten dendritischen Zellen und bei Langerhans-Zellen schwach ausgeprägt, da sich die Zellen in einem unreifen Stadium befanden. CD40 ist auf beiden Zelltypen exprimiert, jedoch auf den Monozyten-generierten dendritischen Zellen mit einer höheren Fluoreszenzintensität.

**A Langerhans Zellen****B Monozyten-generierte DC**

**Abb. 6: *Ex vivo* isolierte humane epidermale Langerhans-Zellen sind phänotypisch vergleichbar mit Monozyten-generierten unreifen dendritischen Zellen.** Humane Langerhans-Zellen wurden aus der Haut von Brustoperationen isoliert. Langerhans-Zellen wurden magnetisch mit einem spezifischen mAk gegen CD1a isoliert (A). Im Vergleich sind unreife Monozyten-generierte dendritische Zellen kultiviert in GM-CSF und IL-4 Tag 6 dargestellt (B). Die Histogramme zeigen eine Analyse der Oberflächenmoleküle ICOS-L (gefärbt mit dem mAk HIL-131 bzw. dem mu ICOS-hu Ig, beide PE-gekoppelt), CD80, CD86, CD83 und CD40 in der Durchflußzytometrie. Die schwarzen Kurven zeigen die Färbung mit dem Isotyp und die offenen Kurven die Expression der angezeigten Moleküle. Die eingefügten Zahlen geben die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 5.

### 3.1.5 *In vivo* wird ICOS-L von Langerhans-Zellen humaner Haut exprimiert

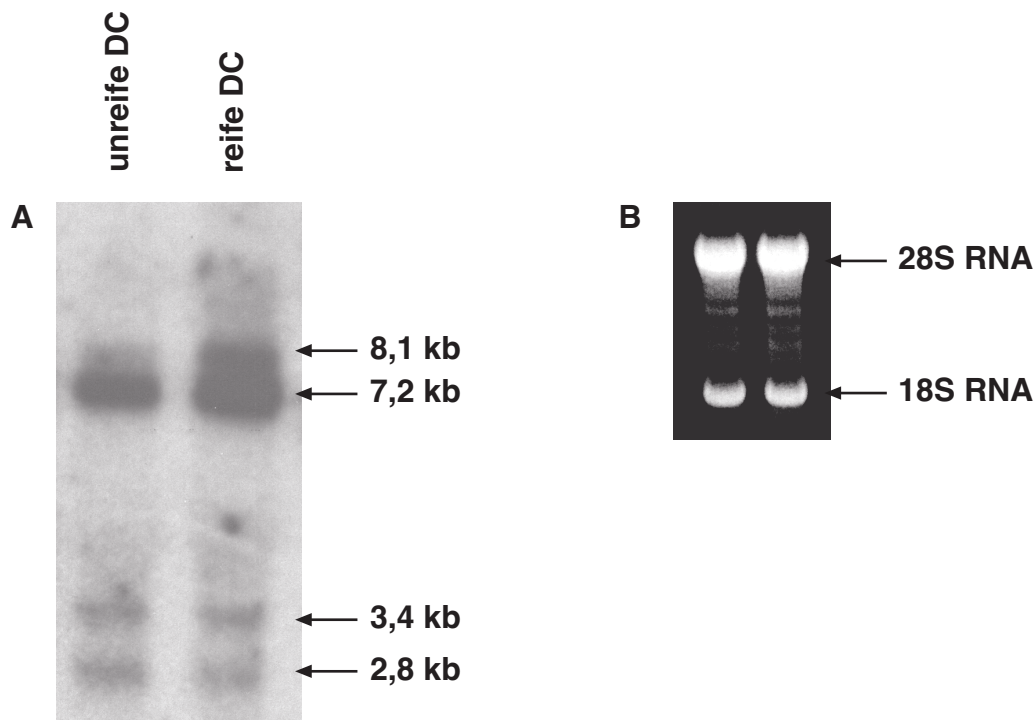
Histologische Untersuchungen von Gefrierschnitten humaner Haut ergaben eine Färbung von ICOS-L mit dem mAk HIL-93 (Abb. 7, links). Die Färbung mit dem mAk OKT6 gegen das Langerhans-Zell-spezifische Oberflächenantigen CD1a identifizierte die Zellen als Langerhans-Zellen (Abb. 7, rechts). Außerdem färbten Keratinozyten positiv für ICOS-L. Die Färbung von ICOS-L auf Keratinozyten wurde auf sich in Suspension befindlichen Keratinozyten in der Durchflußzytometrie bestätigt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 7: In der Histologie der Haut ist ICOS-L auf Langerhans-Zellen exprimiert.** Gefrorene Gewebestücke humaner Haut aus Brustoperationen wurden immunhistologisch mit dem ICOS-L spezifischen mAk HIL-93 angefärbt. Zum Vergleich wurde mit dem mAk OKT6 gefärbt, der den Langerhans-Zell-spezifischen Marker CD1a erkennt. Ebenso färbten Keratinozyten positiv für ICOS-L.

### 3.1.6 ICOS-L mRNA wird in unreifen und in reifen dendritischen Zellen transkribiert

Die Expression von ICOS-L auf RNA Ebene wurde mit einer Northern Analyse überprüft (Abb. 8A). Die Detektion von ICOS-L mRNA mit einer  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierten ICOS-L cDNA-Sonde ergab vier Banden der Längen 8,1 kb, 7,2 kb, 3,4 kb und 2,8 kb sowohl in der RNA unreifer als auch in der RNA mit IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE $_2$  und TNF- $\alpha$  gereifter dendritischer Zellen. Abb. 8B demonstriert die gleichmäßige Beladung des Gels mit RNA unreifer und reifer dendritischer Zellen.



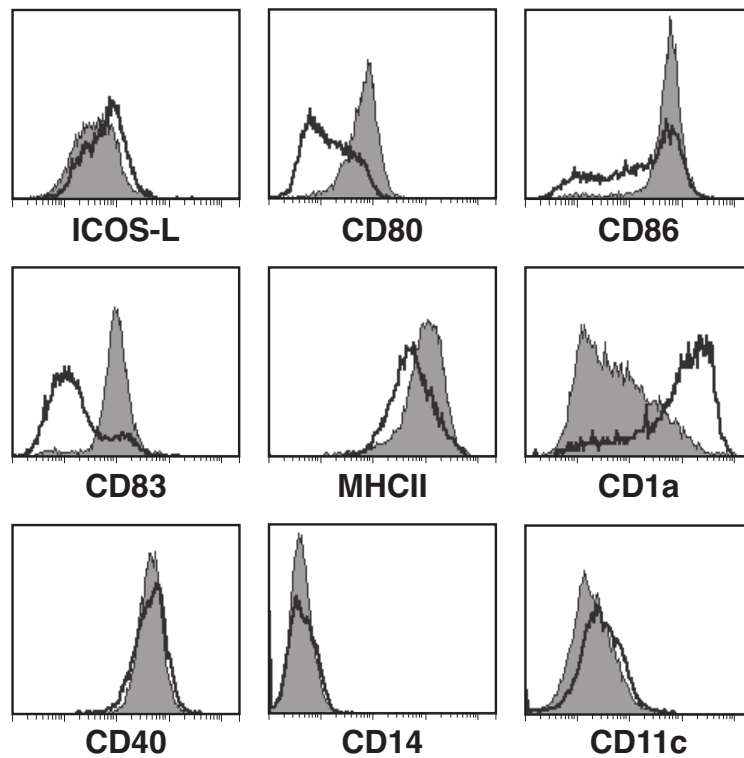
**Abb. 8: Expression von ICOS-L mRNA.** Unreife dendritische Zellen wurden aus Monozyten mit IL-4 und GM-CSF bis Tag 7 generiert, reife dendritische Zellen wurden zusätzlich ab Tag 7 mit einer Zytokin-Kombination bis Tag 9 stimuliert. Gesamt-RNA wurde aus unreifen und reifen dendritischen Zellen präpariert und je 10  $\mu\text{g}$  in einem RNA-Gel aufgetrennt. Die Expression von ICOS-L wurde durch Northern Blot Analyse mit einer  $^{32}\text{P}$ -radioaktiv markierten ICOS-L-Sonde festgestellt. Die Exposition betrug 3 Tage (A). (B) zeigt die Etidium Bromid gefärbte 28S und 18S RNA zur Demonstration der einheitlichen Beladung beider Banden.



### 3.1.7 Phänotypische Charakterisierung von unreifen und reifen dendritischen Zellen

Nach Kultur in IL-4 und GM-CSF waren unreife dendritische Zellen ICOS-L<sup>medium</sup>, CD80<sup>medium</sup>, CD86<sup>medium</sup>, CD83<sup>low</sup>, MHCII<sup>medium</sup>, CD1a<sup>high</sup>, CD40<sup>high</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>medium</sup>. Ausreifen Monozyten-generierter dendritischer Zellen kann *in vitro* durch die Gabe verschiedener Zytokine wie IL-1, IL-6, Prostaglandinen und Tumor Nekrose Faktor (TNF) geschehen, Zytokine, die *in vivo* von Keratinozyten sezerniert werden.

Abb. 9 zeigt exemplarisch einen Reifungsstimulus. Unreife dendritische Zellen wurden am Tag 7 für 48 h mit einer Kombination verschiedener Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ ) stimuliert [83] oder in IL-4 und GM-CSF als Kontrolle für 48 h weiterkultiviert. Die offenen Kurven zeigen die Kontrollkultur am Tag 9. IL-4 und GM-CSF alleine führte nicht zu einer Reifung der Zellen. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 waren exprimiert, jedoch führte die Stimulation mit der Zytokin-Kombination zu einer dramatischen Heraufregulation dieser Moleküle. Der Reifungsmarker CD83 wurde nur von einem geringen Anteil der Zellen in der Kultur ohne Reifungsstimulantien exprimiert. Nach Ausreifen exprimierten alle dendritischen Zellen CD83. Die Expression von MHCII war bereits auf unreifen dendritischen Zellen hoch, jedoch führte das Ausreifen der Zellen zu einer noch höheren Expression. Auch *in vivo* nimmt die Expression bei der Migration dendritischer Zellen und damit einhergehender Reifung zu den sekundär-lymphatischen Organen zu [2]. CD1a verhielt sich in seiner Expression umgekehrt zu MHCII. CD1a ist ein MHC I ähnliches Molekül, spielt eine Rolle bei der Präsentation von Lipid-Antigenen und ist u. a. auf unreifen Langerhans-Zellen exprimiert [1;85]. Ausreifen der dendritischen Zellen führte wie erwartet zu einer Abnahme von CD1a und einer Zunahme von MHCII. CD40 wurde durch die Stimulation der dendritischen Zellen nicht beeinflusst. Dieses kostimulatorische Molekül war bereits auf unreifen dendritischen Zellen hoch exprimiert. Der Monozytenmarker CD14 wurde erwartungsgemäß weder von unreifen dendritischen Zellen noch von gereiften dendritischen Zellen exprimiert. Abb. 5 zeigt, daß dendritische Zellen diesen Marker bereits nach 48 h Kultur in einem Differenzierungsmedium herunterregulierten. Das von myeloiden Zellen exprimierte CD11c zeigte keine Veränderung durch Ausreifen der Kultur.



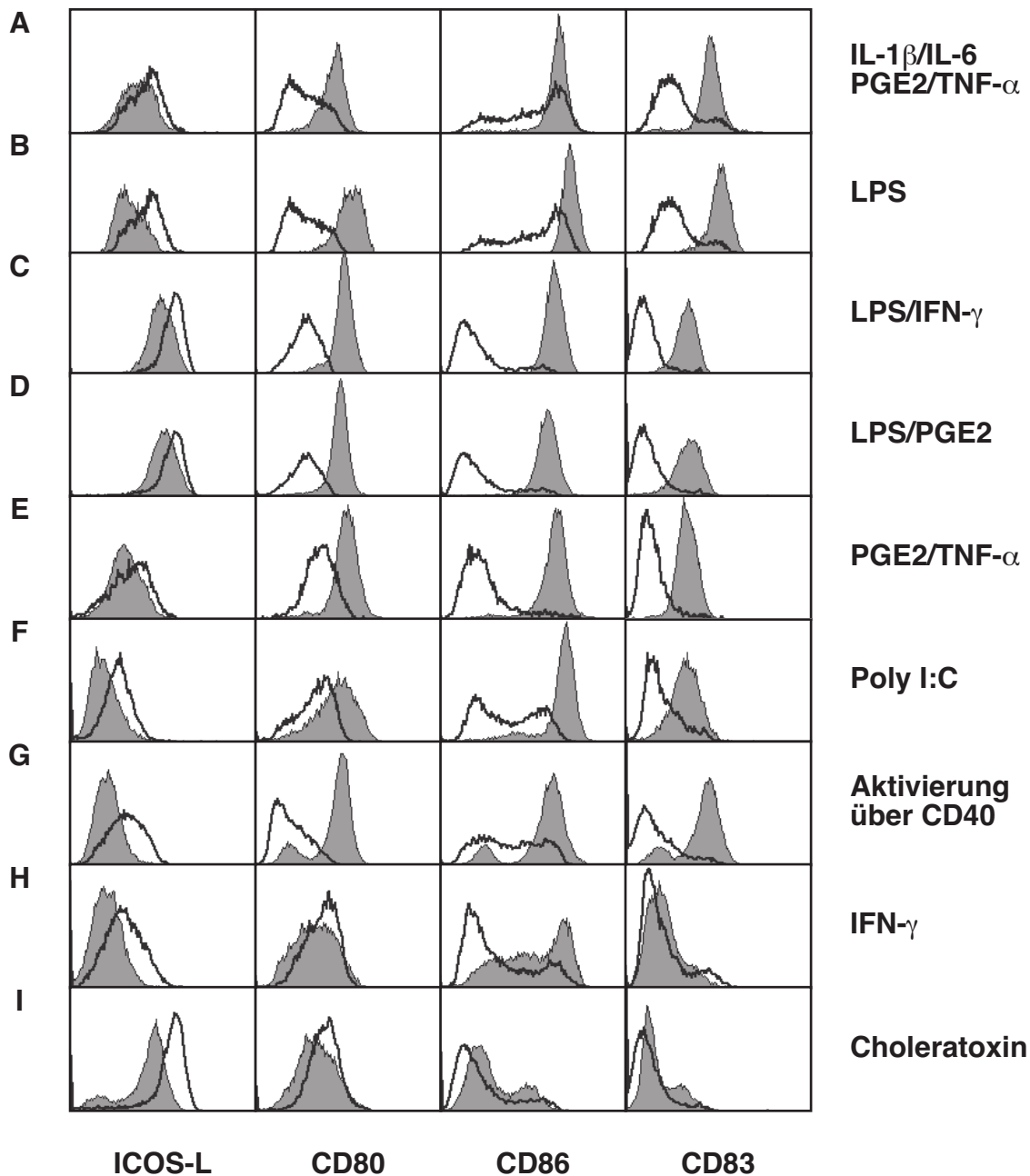
**Abb. 9: Phänotypische Charakterisierung von Monozyten-generierten dendritischen Zellen vor und nach Reifung mit einer Zytokin-Kombination.** Dargestellt ist die Oberflächenexpression von Antigenen auf dendritischen Zellen. Unreife, mit IL-4 und GM-CSF aus Monozyten generierte dendritische Zellen wurden ab Tag 7 mit IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  für 48 h stimuliert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Die dunkelgrauen Kurven zeigen die gereiften dendritischen Zellen. Die offenen Kurven zeigen die unstimulierte Kontrollkultur am Tag 9 nur in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von 8.

### 3.1.8 Reifung dendritischer Zellen führt zu reverser Regulation von CD80/CD86 und ICOS-L

Um zu testen, wie sich verschiedene Stimulantien auf die Expression von kostimulatorischen Molekülen und auf den Reifungszustand von dendritischen Zellen auswirken, wurden unreife dendritische Zellen am Tag 6 oder am Tag 7 mit verschiedenen Reagenzien stimuliert und der Einfluß auf die Expression von Oberflächenantigenen untersucht (Abb. 10A-I). Von besonderem Interesse war der Einfluß der Stimulantien auf CD80, CD86 und ICOS-L, den natürlichen Liganden der T-Zell-spezifischen Moleküle CD28, CTLA-4 und ICOS. Zusätzlich wurde der Reifungsmarker CD83 [2] untersucht.

Stimulation von dendritischen Zellen mit einer Kombination aus IL-1 $\beta$ /IL-6/PGE<sub>2</sub>/TNF- $\alpha$  (Abb. 10A) [83], LPS (Abb. 10B), LPS/IFN- $\gamma$  (Abb. 10C), einer Kombination aus LPS/PGE<sub>2</sub>

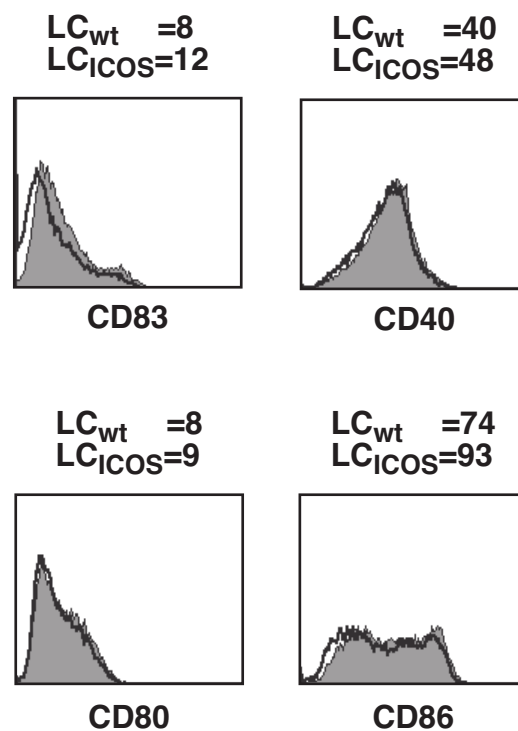
(Abb. 10D) [86], einer Kombination aus PGE<sub>2</sub>/TNF- $\alpha$  (Abb. 10E) [87], doppelsträngiger RNA Poly I:C (Abb. 10F) [88] oder Stimulation über CD40 mit einer CD40L transfizierten Zelllinie (Abb. 10G) [17] führte zu einer Heraufregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 im Vergleich zu der nicht stimulierten Kontrolle. Die Grundexpression der Moleküle bei den unstimulierten Kontrollen war unterschiedlich zwischen verschiedenen Experimenten und Spendern. Auch führten diese Reagenzien zu einer maximalen CD83 Expression. IFN- $\gamma$  und Choleratoxin (Abb. 10H-I) [89] stimulierte Kulturen zeigten jedoch nur für CD86 eine Zunahme der Expression, CD80 und CD83 waren im Vergleich zur Kontrolle kaum beeinflusst. ICOS-L wurde durch alle Stimulantien leicht herunterreguliert, so daß sich die Expression dieses Moleküls nach Stimulation für die getesteten Reagenzien revers zu CD86 (Abb. 10A-H) und zusätzlich revers zu CD80 (Abb. 10A-G) verhielt. Anzumerken ist, daß die Reifung mit der Kombination LPS/PGE<sub>2</sub> einen Typ von dendritischen Zellen hervorbringen soll, der naive T-Zellen zu Th2-Zellen polarisieren kann [86]. T-Zellen, die mit so gereiften dendritischen Zellen stimuliert werden, produzieren angeblich wenig IFN- $\gamma$  und viel IL-4. Für geplante funktionelle Experimente zur Rolle von ICOS-L und ICOS in der Kooperation von dendritischen Zellen mit T-Zellen war dieser Reifungsmodus von großem Interesse.



**Abb. 10: Reverse Regulation von CD80/CD86 und ICOS-L nach Stimulierung von dendritischen Zellen mit verschiedenen Stimulantien.** Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wird durch verschiedene Reifungsstimulantien erhöht, während die Expression von ICOS-L nach Reifung und Aktivierung der dendritischen Zellen unverändert blieb oder leicht abnahm. Die Expression von CD83 zeigt den Reifungsstatus der dendritischen Zellen. Unreife mit IL-4 und GM-CSF aus Monozyten generierte dendritische Zellen wurden am Tag 6 bzw. am Tag 7 mit (A) einer Zytokinkombination (IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ ), (B) LPS, (C) LPS/IFN- $\gamma$ , (D) LPS/PGE<sub>2</sub>, (E) PGE<sub>2</sub>/TNF- $\alpha$ , (F) Poly I:C, (G) CD40-L transfizierten L-Zellen, (H) IFN- $\gamma$  oder (I) Cholera toxin inkubiert. Die Expression der kostimulatorischen Liganden CD80, CD86, ICOS-L und des Reifungsmarkers CD83 wurde am Tag 9 mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Grau ausgefüllte Kurven zeigen die stimulierte Kultur am Tag 9, offene Kurven repräsentieren die unstimulierte Kontrollkultur am Tag 9. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 5.

### 3.1.9 Stimulation über ICOS-L durch eine ICOS-Transfektante führt nicht zu Reifung von dendritischen Zellen

Nach Austesten verschiedener Reagenzien zur Reifung und Stimulation von dendritischen Zellen besonders im Hinblick auf die Effekte auf die kostimulatorischen Liganden CD80, CD86 und ICOS-L (Abb. 10) stellte sich die Frage, ob dendritische Zellen über ICOS-L einen Aktivierungs- oder Reifungsstimulus erhalten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden unreife dendritische Zellen am Tag 6 mit einer ICOS exprimierenden Transfektante (ICOS L-Zellen) für 72 h kokultiviert (Abb. 11). Als Kontrolle wurden unreife dendritische Zellen mit WT L-Zellen kultiviert. Es war zu beobachten, daß die Bindung von ICOS-L mit ICOS nicht zu einer Reifung der Zellen führte, der Reifungsmarker CD83 blieb unbeeinflusst. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, und CD40 blieb unverändert.

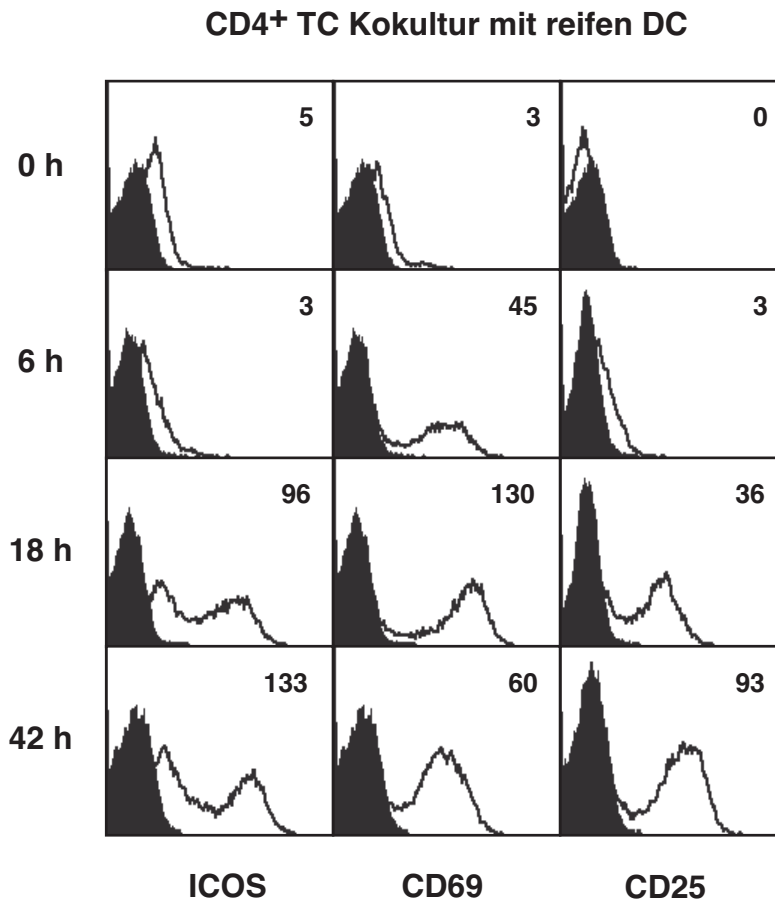


**Abb. 11: Bindung von ICOS-L mit ICOS führt nicht zu einer Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen.** Unreife dendritische Zellen wurden am Tag 6 mit einer ICOS exprimierenden Transfektante (ICOS L-Zellen) für 72 h in einem Verhältnis 1 : 1 kokultiviert. Als Kontrolle wurden unreife dendritische Zellen mit WT L-Zellen kultiviert. Die grau ausgefüllten Kurven zeigen dendritische Zellen aus der Kokultur mit der ICOS-Transfektante, die offenen Kurven dendritische Zellen aus der Kokultur mit WT L-Zellen. In der durchflußzytometrischen Analyse wurden die dendritischen Zellen über eine Gegenfärbung mit MHCII und den FSC/SSC von den L-Zellen abgegrenzt. Die Zahlen geben die MFI über die Expression des jeweiligen Moleküls an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 4.

### 3.2 Regulation von ICOS und ICOS-L in der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen

#### 3.2.1 ICOS wird auf CD4<sup>+</sup> und auf "naiven" CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen in der Interaktion mit reifen dendritischen Zellen stark heraufreguliert

Dendritische Zellen sind sehr potente Stimulatoren für CD4<sup>+</sup> T-Zellen [2]. Es wurde der Einfluß der Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Zellen auf die Expression von ICOS untersucht. Zum Vergleich wurden die Aktivierungsantigene CD69 und CD25 herangezogen (Abb. 12). In den Kokulturen wurde ein Superantigen-Gemisch aus SEA, SEB, TSST eingesetzt. Abb. 12 zeigt die Veränderung von ICOS und der Aktivierungsmarker CD69 und CD25. CD25 stellt als  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors einen gut untersuchten Marker für aktivierte T-Zellen dar, ebenso CD69, das auch als *Activation Inducer Molecule* bezeichnet wird. Nach magnetischer Zellsortierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut zeigten die T-Zellen einen nicht aktivierten Phänotyp. ICOS, CD69 und CD25 waren wenig oder gar nicht auf der Oberfläche nachweisbar. Nach Stimulation der T-Zellen mit reifen dendritischen Zellen, war bereits nach 6 h eine leichte Zunahme von CD69 zu beobachten, während ICOS und CD25 nicht beeinflußt wurden. Nach 18 h war die Expression von ICOS, CD69 und CD25 stark erhöht. Nach 42 h war die Expression von ICOS und CD25 maximal, während CD69 wieder leicht abnahm. In der Kontrollkultur (T-Zellen in Anwesenheit von Superantigen, aber ohne dendritische Zellen) blieben alle Zellen negativ für ICOS, CD69 und CD25 (nicht gezeigt).

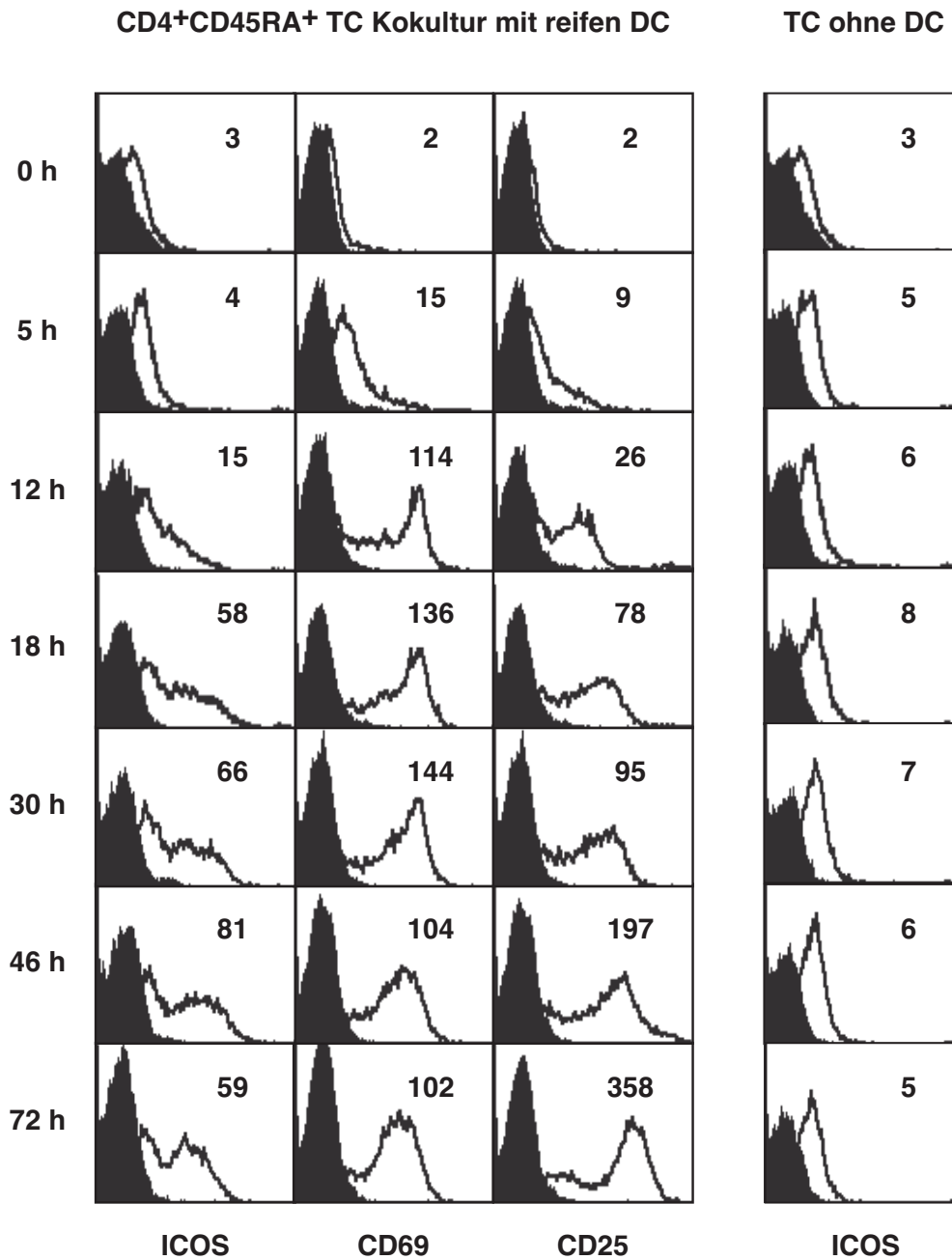


**Abb. 12: CD4<sup>+</sup> T-Zellen regulieren ICOS in Kokultur mit reifen dendritische Zellen herauf.** Dargestellt ist die Oberflächenexpression von ICOS im Vergleich zu den T-Zell-Aktivierungsmolekülen CD25 und CD69 auf T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in einer Kokultur mit dendritischen Zellen in Anwesenheit von Superantigen (SEA, SEB, TSST). Die eingesetzten dendritischen Zellen waren mit einer Zytokin-Kombination (IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ ) am Tag 7 für 48 h gereift. Die Analyse der Oberflächenmoleküle erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Das unspezifische Hintergrundsignal ist schwarz dargestellt, die eingefügten Zahlen geben die MFI an. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von 2 nach Etablierung der optimalen Kokulturbedingungen.

Abb. 13 zeigt die Expression von ICOS, CD25 und CD69 auf "naiven" CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen aus einer Kokultur mit reifen dendritischen Zellen und Superantigen SEB in Abhängigkeit von der Zeit. ICOS war auch in geringem Maß auf "naiven" CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen direkt nach der Isolierung aus dem peripheren Blut exprimiert. CD25 und CD69 wurden nicht exprimiert. ICOS kam nach 12 h deutlich auf die Oberfläche und erreichte ein Maximum nach 46 h. CD69 nahm über die Zeit am schnellsten zu, erreichte ein Maximum bei 30 h und ging dann leicht zurück. CD25 dagegen kam wesentlich langsamer auf die Oberfläche und erreichte erst nach 72 h eine maximale Expression. In der Kontrollkultur CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mit SEB ohne dendritische Zellen ist keine Zunahme von ICOS zu beobachten.

Im Unterschied zur Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 12) mit dendritischen Zellen ist die ICOS Expression bei CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen verlangsamt und nicht so stark (Abb. 13).

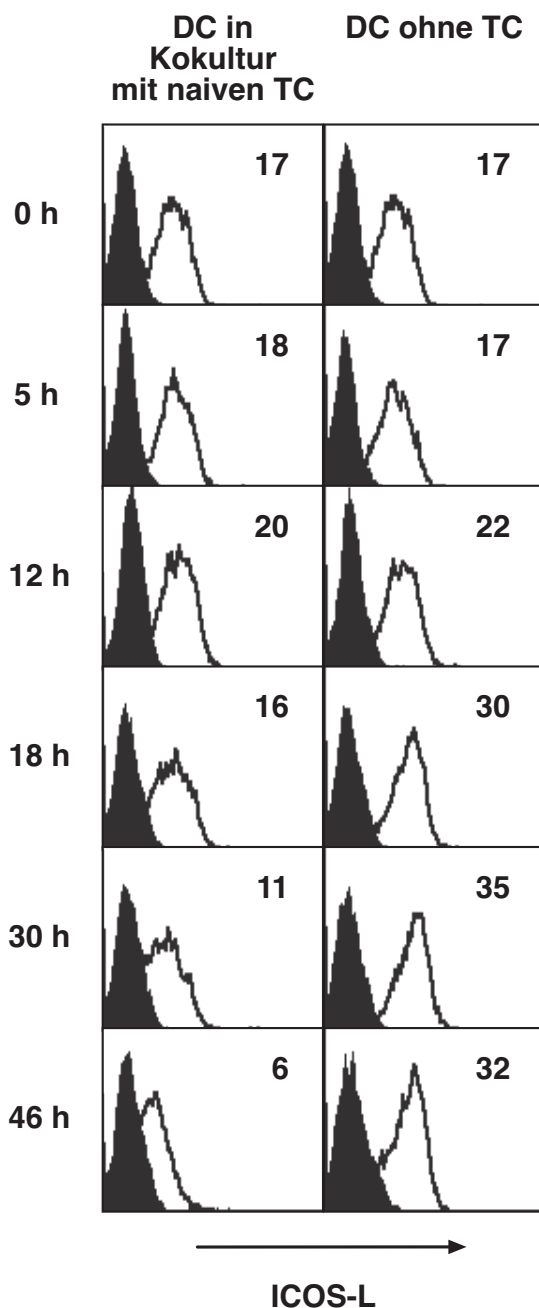




**Abb. 13: “Naive” CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen regulieren ICOS in der Kokultur mit reifen dendritischen Zellen herauf und werden aktiviert.** Dargestellt ist die Oberflächenexpression der T-Zell-Aktivierungsmoleküle ICOS, CD69 und CD25 auf “naiven” T-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten bis zu 72 h nach Beginn der Kokultur. Zeitpunkt 0 h zeigt den Aktivierungszustand der T-Zellen zu Beginn der Kokultur. Für die Kokultur wurden T-Zellen und dendritische Zellen in einem Verhältnis von 10 : 1 kultiviert. Die Reifung der in der Kokultur eingesetzten dendritischen Zellen erfolgte mit LPS und PGE<sub>2</sub> am Tag 6 für 48 h. Die Kokultur erfolgte in Anwesenheit von Superantigen (SEB). Als Kontrolle dienten mit SEB kultivierte CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen ohne dendritische Zellen. Hier wurde eine verstärkte Expression von CD25, CD69 (nicht gezeigt) und ICOS nicht beobachtet. Das unspezifische Hintergrundsignal ist schwarz dargestellt, die eingefügten Zahlen geben die MFI an. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von 3 nach Etablierung der optimalen Kokulturbedingungen.

### 3.2.2 ICOS-L wird auf dendritischen Zellen in Kokultur mit $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen herunterreguliert

Die Expression von ICOS-L auf dendritischen Zellen in der Kokultur mit T-Zellen ist in Abb. 14, links gezeigt. Es war eine leichte Herunterregulation von ICOS-L zu beobachten, diese Herunterregulation war T-Zell-abhängig, da die Expression von ICOS-L in der Kontrollkultur (Abb. 14, rechts) in Anwesenheit von SEB ohne T-Zellen sogar zunahm. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 blieben unverändert oder wurden in einigen Experimenten sogar noch heraufreguliert (Daten nicht gezeigt).



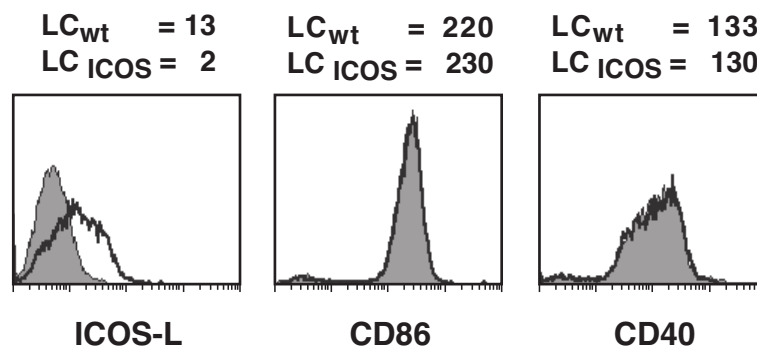
**Abb. 14: Reife dendritische Zellen zeigen in Kokultur mit "naiven"  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen und Superantigen eine Herunterregulation von ICOS-L.** Dargestellt ist die Oberflächenexpression von ICOS-L (gefärbt mit mAk HIL-131-PE) auf dendritischen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bis 46 h nach Beginn der Kokultur mit "naiven" T-Zellen. Die Reifung der in der Kokultur eingesetzten dendritischen Zellen erfolgte mit LPS und  $PGE_2$ . Die Kokultur erfolgte in Anwesenheit von Superantigen (SEB). Als Kontrolle dienten mit SEB kultivierte reife dendritische Zellen, hier wurde die Herunterregulation von ICOS-L nicht beobachtet. Die Analyse der Oberflächenmoleküle erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Das unspezifische Hintergrundsignal ist schwarz dargestellt, die eingefügten Zahlen geben die MFI an. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von 3 nach Etablierung der optimalen Kokulturbedingungen.

---

Von Interesse für geplante funktionelle Untersuchungen der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen waren besonders mit einer Kombination aus TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> ausgereifte dendritische Zellen und ihre stimulatorischen Fähigkeiten. Andere Arbeiten haben ergeben, daß so gereifte Monozyten-generierte dendritische Zellen eine Th2-Antwort induzieren können. CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen sollten einen Th2-*Shift* erfahren, das heißt sie produzieren wenig IFN- $\gamma$ , und viel IL-4, wenn sie wiederholt mit LPS/PGE<sub>2</sub> gereiften dendritischen Zellen stimuliert werden [14;86]. Die Oberflächenmarker so gereifter dendritischer Zellen nach Reifung mit diesen Reagenzien ist in Abb. 10E dargestellt. Dieses Protokoll war wichtig für geplante funktionelle Untersuchungen.

### 3.2.3 ICOS-L wird durch die direkte Interaktion mit ICOS herunterreguliert

Um das Phänomen der Herunterregulation von ICOS-L auf dendritischen Zellen nach Interaktion mit T-Zellen (Abb. 14) genauer zu untersuchen, wurden dendritische Zellen mit einer ICOS-Transfektante kokultiviert (Abb. 15). Die WT Zelllinie diente als Kontrolle. Durchflußzytometrische Analysen dieser Kokulturen enthüllten die Tatsache, daß die Herunterregulation von ICOS-L auf dendritischen Zellen abhängig von der Anwesenheit von ICOS war, die spezifisch die Expressionsstärke von ICOS-L verminderte. Die Expression anderer Oberflächenmoleküle wie CD86 und CD40 blieb unverändert. Ähnliche Beobachtungen wurden für ICOS-L auf B-Zellen in der Kokultur mit T-Zellen und mit ICOS-Transfektanten gemacht [65].



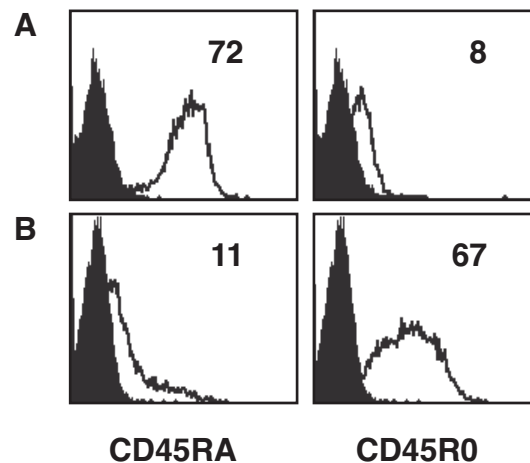
**Abb. 15: Kokultur von reifen dendritischen Zellen mit ICOS transfizierten L-Zellen führt zu einer Herunterregulation von ICOS-L.** Reife dendritische Zellen wurden am Tag 6 mit einer ICOS exprimierenden Transfektante (ICOS L-Zellen) für 72 h im Verhältnis 1 : 1 kokultiviert. Als Kontrolle wurden reife dendritische Zellen mit WT L-Zellen kultiviert. Die grau ausgefüllten Kurven zeigen die Färbung von ICOS-L mit dem PE-gekoppelten mAk HIL-131 auf dendritischen Zellen aus der Kultur mit der ICOS-Transfektante, die offenen Kurven zeigen die Färbung von ICOS-L auf dendritischen Zellen in Kokultur mit den WT L-Zellen. In der durchflußzytometrischen Analyse wurden die dendritischen Zellen über eine Gegenfärbung mit MHCII und den FSC/SSC von den L-Zellen abgegrenzt. Die Zahlen geben die MFI über die Expression des jeweiligen Moleküls an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 4.

### 3.2.4 “Naive” T-Zellen verändern ihren Phänotyp durch die primäre Stimulation und werden zu Gedächtnis/Effektor-T-Zellen

Es sollte getestet werden, ob die in der primären Kokultur mit dendritischen Zellen stimulierten "naiven" CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen eine erneute Aktivierung nach einer Ruhephase erfahren

konnten. Dieser Ansatz war wichtig als Modell für eine Restimulationssituation, in der Antigen-erfahrene T-Zellen erneut stimuliert werden.

Nach der primären Kokultur und einer angeschlossenen Expansionsphase mit rekombinantem IL-2 zeigten die T-Zellen aus einer Kokultue mit reifen dendritischen Zellen nur eine schwache Aktivierung und waren  $CD69^{low}$ ,  $CD25^{low}$  und  $ICOS^{medium}$ , jedoch exprimierten 95% der Zellen CD45R0, einen Marker für Gedächtnis-T-Zellen [90]. Die Expression von CD45RA nahm sehr stark ab. Das Verhältnis von CD45RA und CD45R0 hatte sich umgekehrt (Abb. 16).

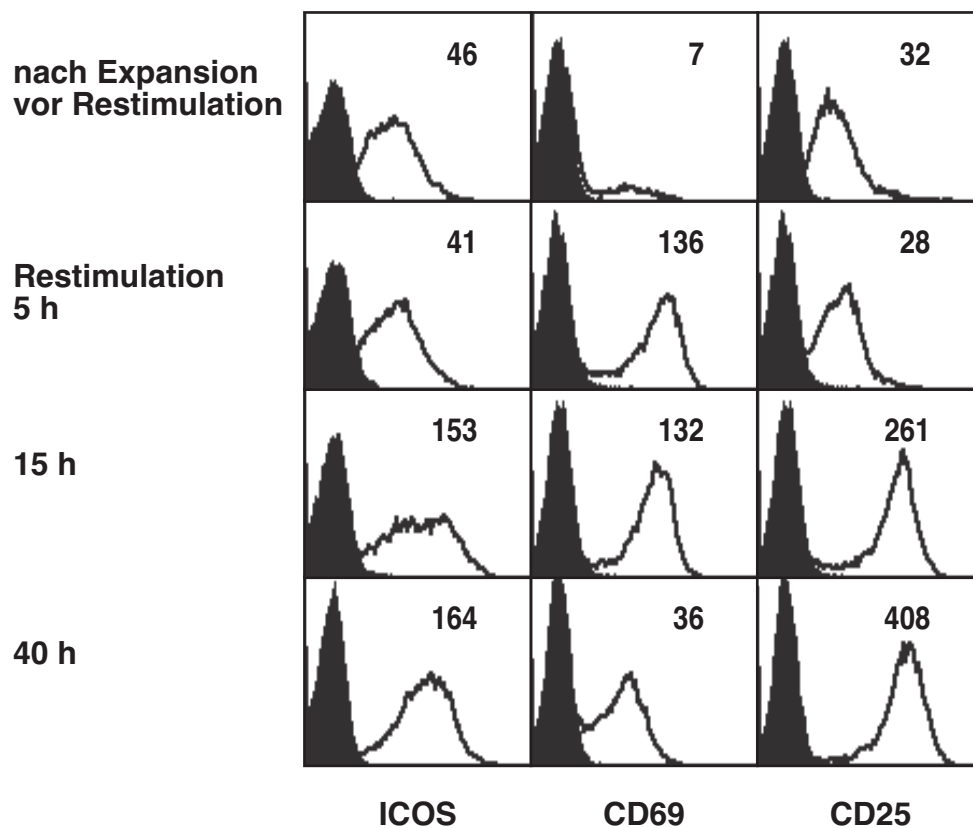


**Abb. 16: Naive T-Zellen exprimieren CD45RA und nach Stimulation die Isoform CD45R0.**  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen wurden durch reife dendritische Zellen (gereift mit LPS/PGE<sub>2</sub>) und Superantigen (SEB) stimuliert. Am Tag 5 wurden die T-Zellen durch rekombinantes IL-2 für 6 Tage expandiert. Die Expression der unterschiedlichen *splice*-Varianten CD45RA und CD45R0 wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie am Tag 11 analysiert. Vor der primären Kokultur der T-Zellen mit dendritischen Zellen befanden sich die T-Zellen in einem nicht aktivierten Zustand (A). Durch die Kokultur mit dendritischen Zellen und die anschließende Expansionsphase wurden die T-Zellen aktiviert (B). Die schwarzen Kurven zeigen die Färbung mit dem Isotyp und die offenen Kurven die Expression von CD45RA und CD45R0. Die eingefügten Zahlen geben die MFI an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3.

### 3.2.5 In einer sekundären Stimulation von T-Zellen wird ICOS erneut heraufreguliert

Naive  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen wurden mit dendritischen Zellen und Superantigen stimuliert. Ab Tag 5 wurden die Kokulturen mit rekombinantem IL-2 für 6 bis 7 Tage expandiert. Die sich in der primären Stimulation nach wenigen Stunden bildenden Aggregate aus T-Zellen und dendritischen Zellen lösten sich durch die IL-2 induzierte Proliferation der T-Zellen auf und die T-Zellen expandierten um den Faktor 50. Um zu prüfen, ob eine erneute Stimulation der expandierten

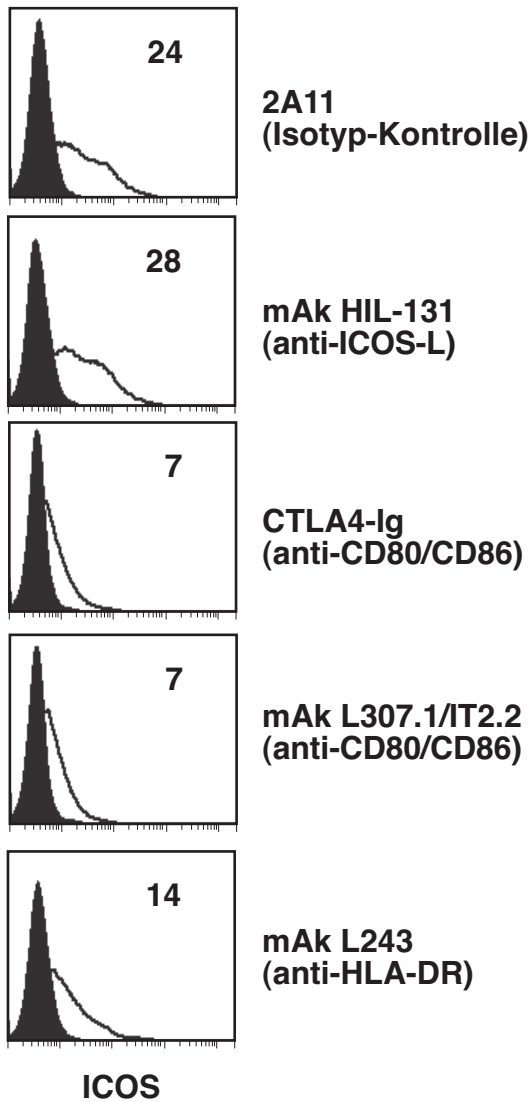
T-Zellen zu einer Reaktivierung der T-Zellen führte, wurden die Aktivierungsmarker CD69, CD25 und ICOS in einer Zeitkinetik in der Durchflußzytometrie analysiert. Abb. 17 zeigt expandierte T-Zellen kurz vor der Restimulation und 5 h, 15 h und 40 h nach Restimulation mit SEB-beladenen dendritischen Zellen. ICOS war auch nach der sechstägigen Expansionsphase deutlich exprimiert, zeigte aber durch die Restimulation eine deutliche Expressionszunahme. CD69 dagegen, in der primären Stimulation  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen der am schnellsten exprimierte Aktivierungsmarker (Abb. 13), war nach der Expansionsphase fast vollständig herunterreguliert und zeigte in der Restimulation bereits nach 5 h eine maximale Expression. Die Expression von CD25 nahm in der Expansionsphase stark ab und erreichte die maximale Expressionsstärke in der Restimulation nach 40 h, wie in der primären Stimulation (Abb. 12 und Abb. 13) nach CD69 und ICOS. Die Sekundärkultur (Abb. 17) zeigt T-Zellen desselben Spenders wie für die Primärkultur, dargestellt in Abb. 13.



**Abb. 17: T-Zellen erfahren eine erneute Zunahme der ICOS Expression in der Restimulation.**  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen wurden durch reife dendritische Zellen (LPS/PGE<sub>2</sub>) und Superantigen (SEB) stimuliert. Am Tag 5 wurden die T-Zellen durch rekombinantes IL-2 für 6 Tage expandiert. Die Restimulation erfolgte erneut mit reifen dendritischen Zellen und Superantigen. Die Histogramme zeigen eine Analyse der Oberflächenmoleküle ICOS, CD69 und CD25 in der Durchflußzytometrie. Die eingefügten Zahlen geben die MFI an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3.

### 3.2.6 Durch die Blockade von CD28/CD80-CD86 in primären und sekundären Kokulturen wird die Expression von ICOS inhibiert

Abb. 18 zeigt die Expression von ICOS in einer Restimulation mit dendritischen Zellen nach 8 h. Dieses Experiment sollte Aufschluß darüber geben, ob die für funktionelle Untersuchungen in den Kokulturen eingesetzten Blockadereagenzien einen Einfluß auf die Expression von ICOS haben. Die Blockadereagenzien waren (wie auch bei den funktionellen Experimentansätzen, s. u.) während der primären Stimulation, während der Expansionsphase und in der Restimulation anwesend. Interessanterweise blieb die ICOS Expression in Anwesenheit des mAk HIL-131 gegen ICOS-L vergleichbar mit der ICOS Expression in Anwesenheit des Isotyps 2A11. Die unterbrochene ICOS/ICOS-L Interaktion hatte offenbar keinen Einfluß auf die ICOS Regulation. Anders verhielt sich ICOS nach Blockade von CD80/CD86 sowohl durch ein Fusionsprotein CTLA-4-Ig als auch durch eine Kombination von den mAk gegen CD80 und gegen CD86. Die Expression war deutlich vermindert. Dieser Sachverhalt wurde bereits in der Kooperation von T-Zellen mit B-Zellen [65] beobachtet. In etwas abgeschwächter Form ist diese verminderte Expression mit dem mAk L243 gegen HLA-DR zu beobachten. Die T-Zellen aus Kokulturen, die mit Blockadereagenzien gegen CD80-CD86 und gegen HLA-DR inkubiert wurden, waren in einem schlechten Zustand.



**Abb. 18: Die Expression von ICOS auf T-Zellen wird durch verschiedene Blockadesituationen in einer Kokultur von T-Zellen mit reifen dendritischen Zellen beeinflusst.** ICOS wird durch die Blockade der CD28/CD80-86 Interaktion gehemmt, während die Blockade von ICOS/ICOS-L die ICOS Expression nicht beeinflusst. Die Histogramme zeigen die Expression von ICOS auf T-Zellen nach einer Restimulation mit dendritischen Zellen. Die primäre Stimulation erfolgte mit reifen dendritischen Zellen (LPS/PGE<sub>2</sub>) und Superantigen (SEB) für 5 Tage, anschließend wurden die T-Zellen mit rekombinatem IL-2 für 6 Tage expandiert. Die Restimulation erfolgte wieder mit reifen dendritischen Zellen (LPS/PGE<sub>2</sub>) und SEB für 8 h. Während der primären Stimulation, der Expansionsphase und der Restimulation waren die Kokulturen 50 µg/ml der Blockadereagenzien 2A11 (Isotypkontrolle), mAk HIL-131 gegen ICOS-L, CTLA-4-Ig (Fusionsprotein) gegen CD80/D86, mAk L307.1 und IT 2.2 gegen CD80 und C86 und mAk L243 gegen HLA-DR ausgesetzt. Die offenen Kurven zeigen die ICOS Expression 8 h nach der Restimulation, die schwarzen Kurven zeigen die Färbung mit der Isotypkontrolle. Die Zahlen geben die MFI an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 4.



### 3.3 Funktioneller Vergleich der ICOS/ICOS-L und CD28/CD80-CD86 Signalwege in der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen

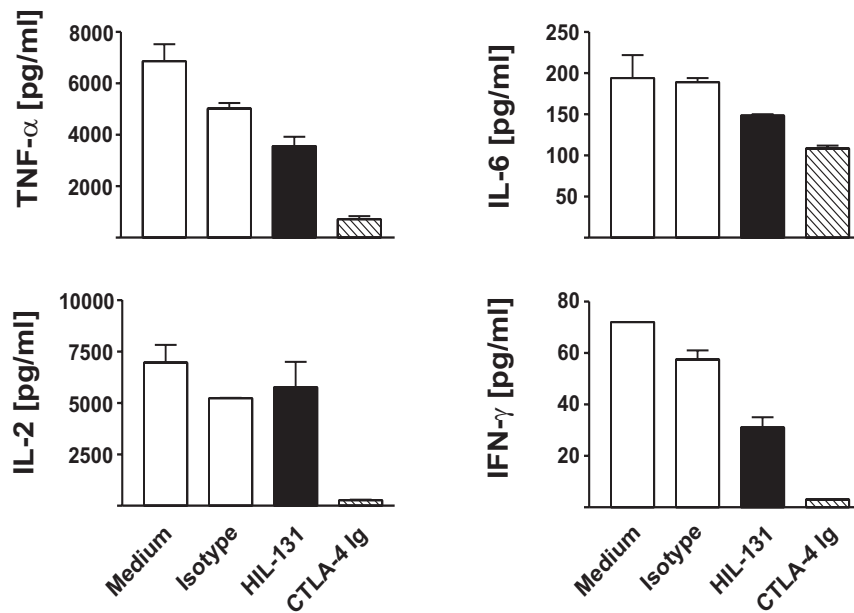
3.3.1 Blockade von CD28/CD80-CD86 führt im Vergleich zur Blockade von ICOS/ICOS-L in der Primärkultur von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mit dendritischen Zellen zu stark verminderter Zytokinsekretion

Um funktionelle Effekte der Interaktion von kostimulatorischen Molekülen mit ihren Liganden zu untersuchen, wurden "naive" CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut mit reifen dendritischen Zellen in Anwesenheit von SEB kokultiviert (Abb. 19). In parallelen Ansätzen wurden entweder die kostimulatorischen Liganden CD80/CD86 durch ein Fusionsprotein CTLA-4-Ig, oder ICOS-L durch den mAk HIL-131 blockiert. Durchflußzytometrische Analysen hatten die Blockadefähigkeit des mAk HIL-131 gezeigt (Abb. 3). Als Kontrollen dienten eine Mediumkontrolle und Zugabe des Isotyp 2A11. Der Zytokingehalt der Kokulturüberstände wurde in ELISA-Assays für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  analysiert. Die Blockade von CD80/CD86 durch CTLA-4-Ig führte zu einer sehr effektiven Inhibition der Zytokinsekretion von IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , während die IL-6-Sekretion nur schwach inhibiert wurde (Abb. 19). Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs durch den mAk HIL-131 hatte keinen Effekt auf die IL-2 Sekretion (0%) und nur sehr geringen Einfluß auf die Sekretion von IL-6 (30%  $\pm$  5.0% SD). Die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurden durch Zugabe des HIL-131 zu 71,2%  $\pm$  14% SD bzw. 36,8%  $\pm$  14% SD blockiert (Abb. 19).

Die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 wurden ebenfalls analysiert, jedoch waren die erhaltenen Mengen unter der Nachweisgrenze der ELISA-Assays. Die mit LPS und PGE<sub>2</sub> gereiften dendritischen Zellen bewirkten nicht wie in Ref. [14;86] behauptet zu einer IL-4 Sekretion durch T-Zellen.

Diese Experimente deuten auf die primäre Rolle der CD28 Kostimulation bei der initialen T-Zell-Aktivierung durch reife dendritische Zellen hin, zeigten jedoch ebenso einen Beitrag von ICOS bei der Generierung einzelner Zytokine. Die Vermutung drängte sich auf, daß ICOS erst in späteren Phasen der T-Zell-Kostimulation seinen Beitrag zur Zytokinproduktion voll entfalten kann. Die Kinetik der ICOS Induktion in der Interaktion sowohl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 12) als auch von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 13) mit dendritischen Zellen bekräftigten diese Vermutung, da ICOS erst nach Stunden exprimiert wurde. CD28 war auf den T-Zellen bereits zu Beginn dieser Kokulturen vorhanden (nicht gezeigt). Deshalb sollten die Auswirkungen der ICOS/ICOS-L

Interaktion in späteren Phasen der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen genauer untersucht werden.



**Abb. 19: Blockade des CD28 Signalwegs in einer primären Kokultur von T-Zellen mit dendritischen Zellen führt zu einer effektiven Blockade der Zytokinsekretion.** Dargestellt ist die Zytokinproduktion in einer primären Stimulation von T-Zellen mit Superantigen beladenen dendritischen Zellen. Die Interaktion der Molekülpaare CD28-CD80/CD86 und ICOS/ICOS-L wurde durch die Zugabe von CTLA-4-Ig bzw. dem mAk HIL-131 blockiert. Die Zellkulturüberstände wurden nach 48 h abgenommen und im ELISA auf Zytokine analysiert. Die Fehlerbalken kommen durch Doppelansätze desselben Spenders zustande. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 9.

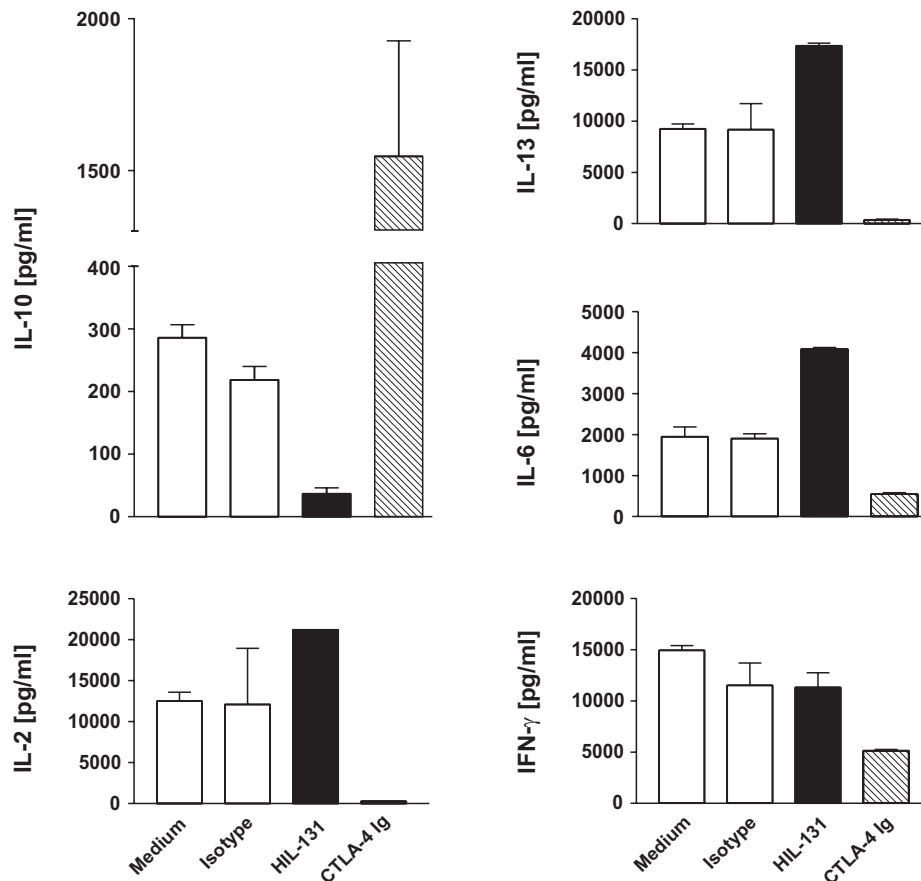
3.3.2 Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Sekundärstimulation inhibiert selektiv IL-10, Blockade des CD28/CD80-CD86 Signalwegs führt dagegen zu einer starken Erhöhung von IL-10 und einer Verminderung von IL-2, IL-6, IL-13 und IFN-γ

Die Blockade des Signalwegs ICOS/ICOS-L hatte in der primären Stimulation von “naiven” CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mit dendritischen Zellen keinen Einfluß auf die Zytokinsekretion von IL-2 bzw. einen schwachen Einfluß auf die Sekretion von IL-6 und im Vergleich zur Blockade von CD28/CD80-CD86 einen schwächeren Einfluß auf die Sekretion von IFN-γ und TNF-α (Abb. 19). Blockade von CD80 und CD86 durch ein Fusionsprotein CTLA-4-Ig blockierte effektiv alle meßbaren Zytokine (Abb. 19). In der primären Stimulation wurde IL-10 nicht ausreichend produziert.

Wiederholte Stimulationen von T-Zellen sind ein *in vivo* vorkommender natürlicher Prozeß. *In vitro* sollte dieser Vorgang durch eine wiederholte Stimulation von T-Zellen mit dendritischen Zellen desselben Spenders nachgeahmt werden.

Hierbei ist zu bedenken, daß es sich bei einer solchen Restimulation um die Stimulation von Gedächtnis/Effektor T-Zellen handelt, da naive T-Zellen nach der primären Stimulation nicht mehr CD45RA, sondern CD45R0 exprimieren (s. Abb. 16).

Um die biologischen Bedeutung der ICOS/ICOS-L Interaktion auf Gedächtnis/Effektor T-Zellen zu untersuchen, wurden naive CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mit reifen dendritischen Zellen und Superantigen stimuliert. Die dendritischen Zellen als Stimulatoren wurden mit LPS und PGE<sub>2</sub> angereicht [14;86], als Superantigen wurde SEB eingesetzt. Für diesen Restimulationsansatz wurden die aktivierten T-Zellen am Tag 5 mit rekombinantem IL-2 bis Tag 12 expandiert und mit SEB-beladenen dendritischen Zellen restimuliert [86]. Die Expansion und Restimulation geschah wiederum in der Anwesenheit von CTLA-4-Ig oder mAk HIL-131 (Abb. 20). In diesem System der sekundären T-Zell-Aktivierung konnte eine IL-10 Produktion nachgewiesen werden. Interessanterweise reduzierte die Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion die IL-10 Sekretion zu 80-90%, während die Blockade des kostimulatorischen Signalwegs CD28/CD80-CD86 die Generierung von IL-10 maßgeblich erhöhte (Abb. 20). Im Gegensatz dazu inhibierte CTLA-4-Ig substantiell die Produktion von IL-2, IL-13, IL-6 und IFN- $\gamma$ , während Anwesenheit von HIL-131 keinen Effekt auf diese Zytokine oder sogar eine leichte Erhöhung zur Folge hatte (Abb. 20). Die Zugabe von exogenem rekombinantem IL-2 zu CTLA-4-Ig enthaltenden Kokulturen oder exogenem rekombinantem IL-10 zu mAk HIL-131 enthaltenden Kokulturen veränderte dieses Zytokinprofil nicht. Somit konnten sekundäre Effekte durch das Fehlen von IL-2 und IL-10 in den Blockadeansätzen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

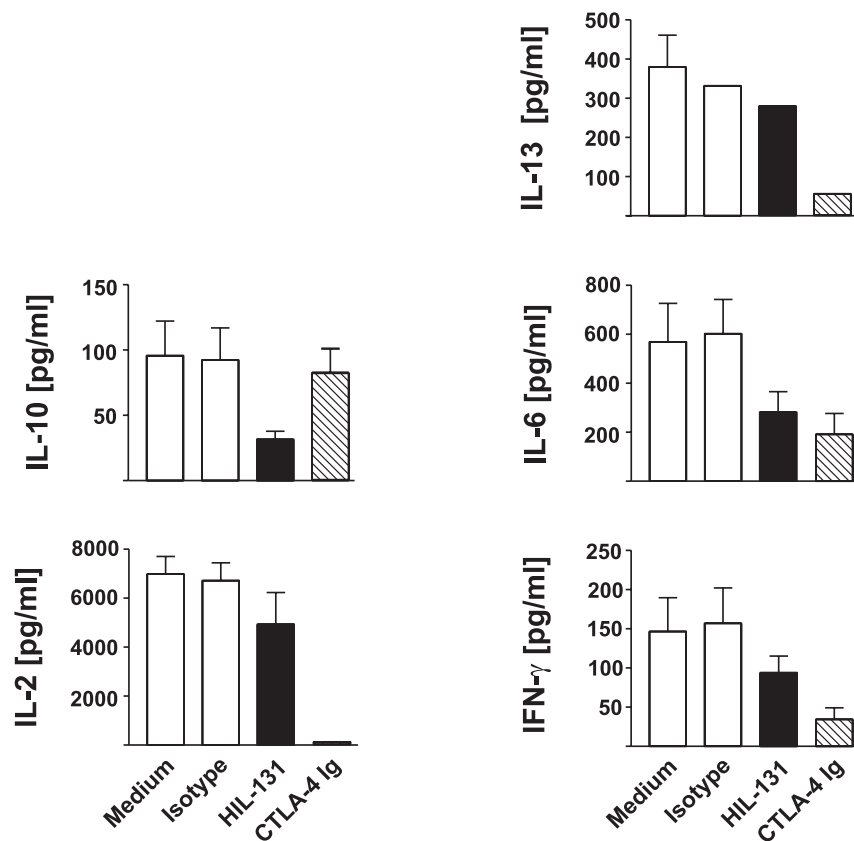


**Abb. 20: Spezifische Inhibition von IL-10 durch Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in einer sekundären Kokultur von T-Zellen mit dendritischen Zellen.** “Naive” CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit reifen dendritischen Zellen in Anwesenheit von SEB für 5 Tage stimuliert, mit rekombinantem IL-2 expandiert und am Tag 12 mit reifen dendritischen Zellen desselben Spenders erneut in Anwesenheit von Superantigen für 36 h restimuliert. Primäre und sekundäre Kokulturen wurden in der Anwesenheit des 2A11 (Isotyp-Kontrolle), mAk HIL-131 oder CTLA-4-Ig durchgeführt. Die Überstände der Kokulturen wurden durch ELISA-Assays auf Zytokinproduktion analysiert. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den Werten von Doppelansätzen. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von 6.

### 3.3.3 Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in der Primärstimulation von Gedächtnis-T-Zellen aus der Tonsille inhibiert selektiv IL-10, während Blockade des CD28/CD80-CD86 Signalwegs IL-10 nicht beeinflusst und IL-2, IL-13 und IFN- $\gamma$ hemmt

T-Zellen aus dem peripheren Blut exprimierten nach der primären Stimulation und der Expansionsphase CD45RO und konnten deshalb zum Zeitpunkt der sekundären Stimulation als Gedächtnis-T-Zellen betrachtet werden (Abb. 16). Die Frage drängte sich auf, ob diese *in vitro* generierten Gedächtnis-T-Zellen mit *ex vivo* isolierten Gedächtnis-T-Zellen vergleichbar waren.

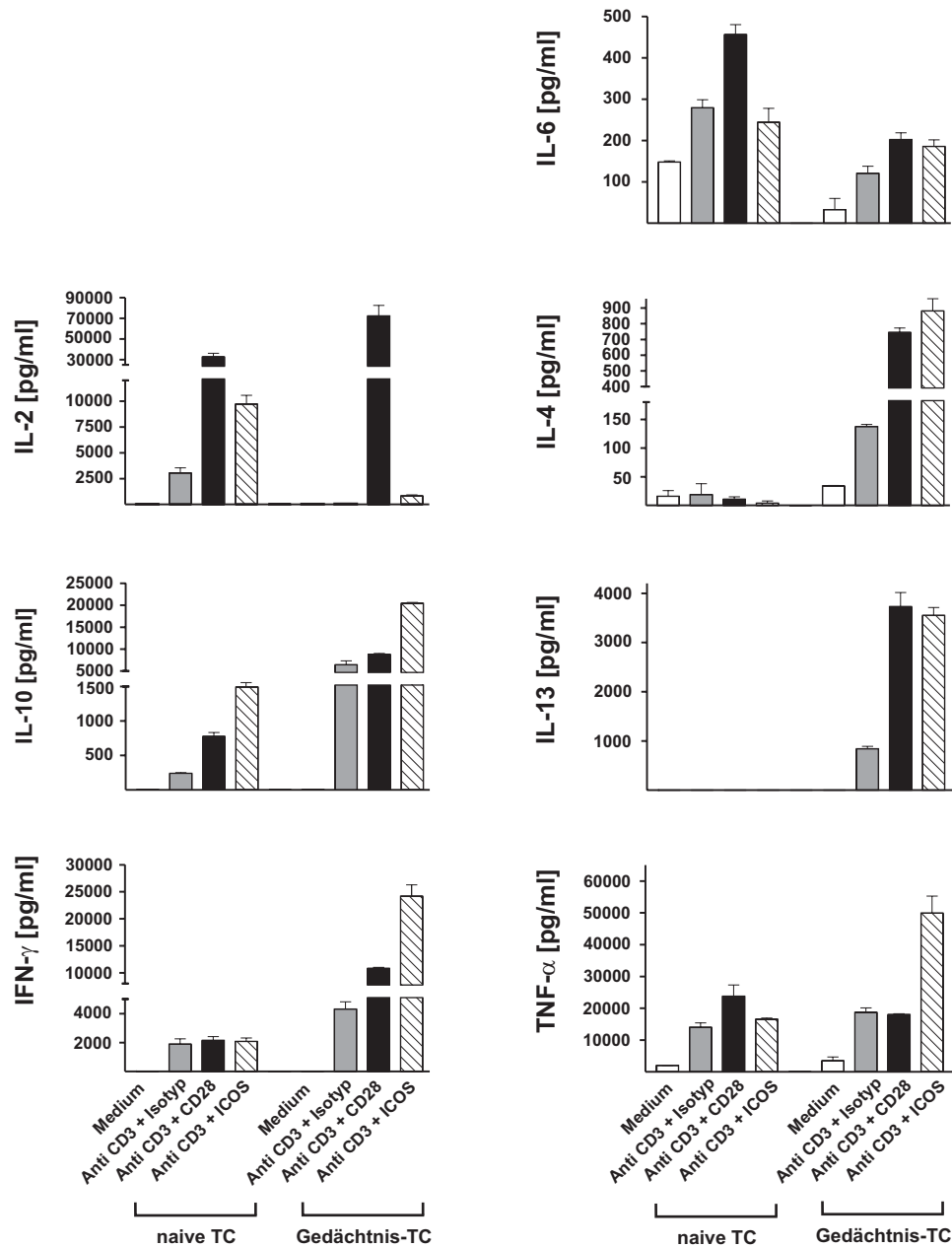
Zur Klärung dieser Frage wurden  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen aus der Tonsille sortiert und mit reifen dendritischen Zellen in Anwesenheit von Superantigen stimuliert (Abb. 21).  $CD4^+CD45R0^+$  tonsilläre T-Zellen exprimierten nach der Isolierung zu 90% ICOS und waren  $CD69^+$ . Es handelte sich also um aktivierte Gedächtnis-T-Zellen, die mit den wiederholt stimulierten T-Zellen des peripheren Bluts vergleichbar waren. Die Überstände aus der Kokultur wurden nach 48 h im ELISA-Assay analysiert. Die Ergebnisse zeigen, daß Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs die Freisetzung von IL-10 stark inhibiert. Die Blockade betrug 50-70% im Vergleich zur Kontrolle. Blockade des ICOS/ICOS-L Signalwegs hatte keinen oder einen geringen Einfluß auf die Freisetzung von IL-2, IL-6, IL-13 und  $IFN-\gamma$ . Interessanterweise hatte die Blockade von CD28/CD80-CD86 keinen Einfluß auf die Freisetzung von IL-10, während die Zytokine IL-2, IL-13, IL-6 und  $IFN-\gamma$  maßgeblich inhibiert wurden.



**Abb. 21: Inhibition von IL-10 durch Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion in einer primären Kokultur von tonsillären Gedächtnis-T-Zellen mit dendritischen Zellen.** Aktivierte  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen aus der Tonsille wurden mit reifen dendritischen Zellen (LPS/PGE<sub>2</sub>) in Anwesenheit von Superantigen (SEB) für 48 h stimuliert. Die Kokultur wurde in der Anwesenheit des 2A11 (Isotyp-Kontrolle), mAk HIL-131 oder CTLA-4-Ig durchgeführt. Die Überstände der Kokulturen wurden durch ELISA-Assays auf Zytokinproduktion analysiert. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den Werten von Doppelansätzen. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von 3.

### 3.4 "Naive" und "Gedächtnis"-T-Zellen des peripheren Bluts unterscheiden sich in ihrem Zytokinprofil nach CD28-Kostimulation im Vergleich zu ICOS-Kostimulation

Der Vergleich der Kokulturen von  $CD4^+CD45RA^+$  und  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen mit Monozytengenerierten dendritischen Zellen in Anwesenheit von Superantigen ergab Unterschiede sowohl in den detektierbaren Zytokinen als auch in der Menge der sezernierten Zytokine (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung, daß primär stimulierte  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen mit einer anschließenden Expansionsphase nicht mehr als "naiv" sondern vielmehr als Gedächtnis-T-Zellen zu bezeichnen waren, da sie nicht mehr CD45RA sondern CD45R0 exprimierten (s. Abb. 16), warf die Frage auf, welche Unterschiede zwischen sog. "naiven" und "Gedächtnis"-T-Zellen bestanden. Um die grundsätzlichen Unterschiede zwischen  $CD4^+CD45RA^+$  und  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen herauszuarbeiten, wurde ein reduktionistischer Ansatz gewählt. Die Stimulation von primären  $CD4^+$  T-Zellen des peripheren Bluts mit Kombinationen von mAk gegen CD3/Isotyp 2A11, CD3/CD28 und CD3/ICOS brachte deutliche Unterschiede zwischen den von  $CD4^+CD45R0^+$  und  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen sezernierten Zytokinen hervor (Abb. 22). Beide Zelltypen waren in der Lage, durch Stimulation über CD3/CD28 und CD3/ICOS substantielle Mengen der frühen Effektor-Zytokine IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  [91;92], und des als antiinflammatorisch bezeichneten Zytokins IL-10 [93] zu produzieren. Auffallend war die Unfähigkeit der  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen, IL-4 und IL-13, beide Zytokine sind in die Inhibition von Th1-Zellen involviert [94], zu produzieren. Die Produktion dieser Zytokine war auf  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen beschränkt. CD3 alleine ohne Kostimulation über CD28 oder ICOS führte zu einer deutlich abgeschwächten Zytokinproduktion sowohl von  $CD4^+CD45R0^+$  als auch von  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen (mit Ausnahme von IL-4 und IL-13). Betrachtet man die Unterschiede zwischen der CD28 und der ICOS Kostimulation, so fällt auf, daß CD28 gegenüber ICOS sowohl in  $CD4^+CD45RA^+$  als auch in  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen bei der IL-2 Produktion einen eindeutig dominierenden Effekt hat. Die Dominanz der CD28 Kostimulation kommt außerdem in der Sekretion von IL-6 und ansatzweise von TNF- $\alpha$  zum Ausdruck und wirkt sich für diese Zytokine aber nur auf  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen aus. Kostimulation über ICOS erweist sich gegenüber CD28 Kostimulation sowohl in  $CD4^+CD45RA^+$  als auch in  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen als dominant bei der Produktion von IL-10. Interessanterweise zeigt sich ICOS-Dominanz auch bei der Produktion des frühen inflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , jedoch nur in  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen. Es läßt sich feststellen, daß ICOS bei der Induktion der Zytokine IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , nicht jedoch für IL-2 und IL-6, eine Dominanz gegenüber CD28 entwickeln kann.



**Abb. 22: “Naive” und Gedächtnis/Effektor-T-Zellen des peripheren Bluts unterscheiden sich in ihrem Zytokinprofil nach Kostimulation durch mAk gegen CD28 und ICOS.** Primäre CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen wurden nach negativer magnetischer Isolierung aus dem peripheren Blut mit immobilisierten mAks stimuliert. Die Stimulation über CD3 mit OKT3 war mit 2 µg/ml optimal. Die Stimulation über die kostimulatorischen Moleküle erfolgte mit den mAk gegen CD28 und ICOS bzw. dem Isotyp. Die Überstände wurden nach 48 h in einem ELISA-Assay auf die dargestellten Zytokine analysiert. Links in den Balkendiagrammen ist das Zytokinmuster der CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen, rechts das Zytokinmuster der CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus parallelen Ansätzen.