Aus dem Robert-Koch-Institut

Molekulare Immunologie

DISSERTATION

Induktionsbedingungen und kostimulatorische Effekte von ICOS – einem neuen T-Zellspezifischen Oberflächenantigen

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Anna-Maria Dittrich
aus Göttingen

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. R.A. Kroczek

2. Prof. Dr. A. Radbruch

3. Prof. Dr. A. Ziegler

Datum der Promotion: 15.01.01

INHALTSVERZEICHNIS

1 BEGRIFFE UND ABKÜRZUNGEN 6

2 EINLEITUNG 9

3 AUFGABENSTELLUNG 13

4 MATERIAL UND METHODEN 14

4.1 MATERIALIEN UND REAGENZIEN 14
4.1.1 Reagenzien für ELISAs 14
4.1.1.1 Antikörper 14
4.1.1.2 Standards 14
4.1.2 Antikörper und Sekundärreagenzien für die Durchflußzytometrie 15
4.1.2.1 Antikörper 15
4.1.2.2 Sekundärreagenzien und -antikörper: 16
4.2 ZELLPRÄPARATION 16
4.2.1 Zellzählung 16
4.2.2 Präparation von „Nylon-T-Zellen“ 16
4.2.3 Aufreinigung von $CD4^+$,$CD8^-$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen 17
4.2.4 Mitomycin-Behandlung 17
4.2.5 Präparation von tonsillären B-Zellen 17
4.2.5.1 Aufreinigung von tonsillären B-Zellen 18
4.2.5.2 Präparation einer Schafserythrozytensuspension für die Depletion von T-Zellen 18
4.3 STIMULATION VON ZELLEN 18
4.3.1 Stimulation von T-Zellen 18
4.3.1.1 Stimulation mit PMA und/oder Ionomycin 18
4.3.1.2 Stimulation mit PHA P 19
4.3.1.3 Stimulation durch immobilisierte Antikörper 19
4.3.2 Stimulation von B-Zellen 19
4.4 PROLIFERATIONSASSAY 20
4.5 ENZYMIMMUNOASSAYS (ELISA) ZUR BESTIMMUNG VON LÖSLICHEN PROTEINEN IM ZELLKULTURÜBERSTAND 20
4.5.1 Standardprotokoll eines Sandwich-ELISA 20
4.5.2 Abweichungen vom Standardprotokoll bei den anderen ELISAs 21
4.6 DURCHFLUßZYTOMETRIE 21
4.6.1 Anfärbung der Zellen 22
4.6.2 Analyse der angefärbten Zellen 22
4.7 HERSTELLUNG UND ANALYSE VON $F(AB)_2$ FRAGMENTEN 23

5 ERGEBNISSE 24

5.1 UNTERSUCHUNG DER INDUKTIONSBEDINGUNGEN DES ICOS MOLEKÜLS AUF T-LYMPHOZYTEN 24
5.2 KOSTIMULATORISCHE EFFEKTE DES ICOS MOLEKÜLS 29
5.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der kostimulatorischen Wirkung auf die Proliferation 29
5.2.2 Wirkung der Kostimulation durch das ICOS Molekül auf andere T-Zellaktivierungsparameter 31
5.2.2.1 Wirkung auf die Expression anderer Oberflächenaktivierungsantigene am Beispiel von CD25 und CD40L 31
5.2.2.2 Wirkung der Kostimulation durch das ICOS Molekül auf die Zytokinsekretion 33
5.2.2.2.1 Auswirkungen auf die IL-2 Sekretion 34
5.2.2.2.2 Auswirkungen auf die IL-4 Sekretion 35
5.2.2.2.3 Auswirkungen auf die IL-5 Sekretion 36
5.2.2.2.4 Auswirkungen auf die IFN-γ Sekretion 36
5.2.2.2.5 Auswirkungen auf die ATAC Sekretion 38
5.2.2.3 Wirkung der Kostimulation durch das ICOS Molekül auf die durch T-Zellen induzierte Immunglobulin Sekretion von B-Zellen 39
5.2.2.4 Blockade der Interaktion des ICOS Moleküls mit seinem potentiellen Liganden 41
5.2.3 Kostimulation durch das ICOS Molekül bei Initialstimulation über lösliche Stimuli 43
5.3 LANGZEITSTIMULATION ÜBER DAS ICOS MOLEKÜL 45
5.3.1 Differentielle Stimulation in der zweiten Phase–Restimulation über das ICOS Molekül 45
5.3.2 Differentielle Kostimuli in der ersten Stimulationsphase – Langzeitstimulation über das ICOS Molekül 46
5.3.3 Differentielle Kostimulation in der ersten und in der zweiten Stimulationsphase 49

6 DISKUSSION 51

6.1 DIE EXPRESSION DES ICOS MOLEKÜLS IST ABHÄNGIG VON ZWEI SIGNALEN 51
6.2 DAS ICOS MOLEKÜL HAT KOSTIMULATORISCHE WIRKUNGEN AUF VIELE PARAMETER UND INDUZIERT DURCH KOSTIMULATION EIN ICOS SPEZIFISCHES MUSTER AN EFFEKTEN 51
6.3 DIE BLOCKADE DES ICOS MOLEKÜLS MIT DEM ICOS SPEZIFISCHEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPER HAT KEINEN EFFEKT AUF DIE T-ZELLINDUZIERTE IMMUNGLOBULINSYNTHESE 58
6.4 DIE LANGZEITSTIMULATION ÜBER DAS ICOS MOLEKÜL FÜHRT ZU EINER DRASTISCH REDUZIERTEN T-ZELLANTWORT BEI RESTIMULATION 59

7 ZUSAMMENFASSUNG 67

8 LITERATURVERZEICHNIS 68

9 LEBENSLAUF 78

10 ERKLÄRUNG AN EIDES STATT 79

Danksagung

Zum Gelingen der vorliegenden Arbeit haben eine Vielzahl von Leuten beigetragen, denen ich an dieser Stelle danken möchte. Sollte ich bei dieser Aufzählung jemanden vergessen, möge es diejenige mir nicht übelnehmen; die untenstehende Liste ist sicher alles andere als vollständig.

An erster Stelle möchte ich denjenigen Leuten danken, ohne deren Unterstützung ich diese Arbeit nicht angefangen hätte und vielleicht auch nicht zu Ende geführt hätte: Roland, meiner Mutter, meinem Vater, meiner Schwester Lisa, Sophia, Daniel, Bettina – deren Hilfe am Computer unentbehrlich war – und meinen Freundinnen Hanna, Jenny und Judith.

Hinzu kommen alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Molekulare Immunologie“ des Robert-Koch-Instituts, die mir ein Jahr lang mit ihrem Wissen und Kenntnissen zur Seite standen. Insbesondere möchte ich Volker für seine Hilfe am Computer danken und natürlich Andreas, ohne dessen Einweisung, Ratschläge und Hilfe meine Einarbeitung und Arbeit auf diesem Gebiet viel beschwerlicher gewesen wäre.

An dieser Stelle soll auch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Renz nicht unerwähnt bleiben, die es mir ermöglicht hat, viele der Zytokin-ELISAs durchzuführen, deren Resultate wichtige Ergebnisse meiner Arbeit darstellen.

Schließlich danke ich demjenigen, der als Betreuer dieses Projekts den wissenschaftlichen Rahmen meiner Studien vorgegeben hat: Prof. Dr. med. R. Kroczek. Er hat mich während des letzten Jahres vorbildlich betreut, mir unzählige Dinge beigebracht und mir dadurch ermöglicht, die wissenschaftlichen Kenntnisse und Fertigkeiten zu erwerben, um diese Arbeit durchzuführen.

1 Verwendete Begriffe und Abkürzungen

^{3}[H] Thymidin	Tritium-markiertes Thymidin
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod („activation induced cell death")
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
CD	cluster of differentiation (Zellproteinstruktur, die eine Untergruppe von Lymphozyten charakterisiert)
$CD4^{+}$	CD4-Antigen tragende Zellen (Zellen, die andere Antigene als CD4 tragen, werden analog gekennzeichnet)
Ci	Curie
cpm	Ereignisse/Minute
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
CyChrome	Fluoreszenzfarbstoff mit einer Emissionswellenlänge größer als 670 nm
d	Tag
ELISA	Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in einer Lösung („enzyme linked immunoassay)
FACS^{R}	Durchflußzytometrie (eingetragenes Warenzeichen der Firma Becton Dickinson)
FCS	fötales Kälberserum
FDC	Follikulär dendritische Zelle
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff mit einer Emissionswellenlänge bei 525 nm)
g	Fallbeschleunigung
h	Stunde (n)

HSA	Heat-stable Antigen
Hu	Human
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICOS	Inducible co-stimulator
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin der Klasse G (andere Klassen werden analog bezeichnet)
IL	Interleukin
Ionomycin	Ca^{2+}-Ionophore
Kap.	Kapitel
L	Ligand
LFA	Leucocyte function-associated antigen
log	logarithmisch
mAk	monoklonaler Antikörper
mean	drückt die durchschnittliche Dichte der Expression eines Oberflächenantigens aus
MHC	Histokompatibilitätsantigen („major histocompatibility complex“)
NTZ	durch Nylonwollpassage aufgereinigte T-Zellen des peripheren Bluts
OD	Absorption ("optical density")
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff mit einer Emissionswellenlänge bei 575 nm)
PHA	Phytohämagglutinin (Lectin aus Phaseolus vulgaris)
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbolester (Phorbol-12-myristate-13-acetate)
r	rekombinant

R10F+	komplettes RPMI 1640 Medium (s. 4.2.5)
RANK	Receptor Activator of NF-κB
Ref.	Referenz
SLAM	Signaling Lymphocytic Activation Molecule
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
Th1	T-Helferzelle Typ 1 (analog dazu Th2)
TZR	T-Zellrezeptor
U	Einheiten („units“)
UKRV	Universitätsklinikum Rudolf Virchow
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

2 Einleitung

Der auffälligste Unterschied zwischen dem Immunsystem und anderen funktionellen Systemen des menschlichen Körpers, wie z.B. dem Verdauungssystem oder dem Fortpflanzungssystem, ist die Mobilität seiner Zellen. Um ihre Funktion zu erfüllen – den Körper vor schädigenden Parasiten, Bakterien und Viren zu schützen – ist es notwendig, daß die Zellen des Immunsystems in alle Bereiche des Körpers gelangen und dadurch alle seine Bereiche kontrollieren können. Eine weitere auffällige Eigenschaft ist die Vielzahl von unterschiedlichen Zellen, die zusammen das Immunsystem bilden. Bei diesen Grundvoraussetzungen ist es für die "Eu-Funktion" des Immunsystems essentiell, daß ein komplexes Signalnetzwerk existiert. Dieses Netzwerk muß gewährleisten, daß die Zellen an unterschiedlichen Orten im Körper Signale empfangen können, daß sehr unterschiedliche Zelltypen Signale austauschen können und daß diese Signale spezifisch, auf die jeweilige Situation zugeschnitten, wirken. Dieses Netzwerk wird im wesentlichen durch zwei Formen von Botenstoffen gebildet: 1. Proteine auf der Zelloberfläche, die einen spezifischen Signalaustausch von einer Zelle zur anderen ermöglichen und 2. Zytokine, d.h. lösliche Signale, die von diesen Zellen sezerniert werden und die über weite Strecken wirken und mehr als eine Zelle ansprechen können.

Die Funktion der Zellen des Immunsystems bei einer Antigen-spezifischen Immunabwehrreaktion wird wesentlich von T-Zellen gesteuert. Um dieser Aufgabe gerecht werden zu können, verfügen die T-Zellen über ein großes Repertoire von Signalmolekülen.

Von Anfang an wird jede Immunantwort streng reguliert. Bereits die Initiation einer Immunantwort wird durch einen spezifischen, selektiven Kommunikationsweg kontrolliert: Die vollständige Aktivierung der T-Zelle in vivo und in vitro ist nur möglich, wenn ihr einerseits über ein Histokompatibilitäts-Molekül (MHC-Molekül) das Antigen (Ag) präsentiert wird, das sie über ihren T-Zellrezeptor (TZR) erkennen kann. Zusätzlich benötigt die T-Zelle allerdings auch noch ein zweites Signal, ein sogenanntes „kostimulatorisches“ Signal über ein weiteres Rezeptor-Ligandenpaar *[Müller, D.L. et al., 1989, Schwartz, R.H. et al., 1990, Weiss, A., 1993]*. Dieses Signal kann durch die Ag-präsentierenden Zellen (APC) vermittelt werden, die auch das Ag präsentiert, möglicherweise aber auch über „third party cells“ *[Samson, D.M. et al, 1993]*. Ohne die zusätzliche Kostimulation wird die T Zelle anerg, d.h. sie kann durch erneute Stimulation nicht mehr aktiviert werden, oder aber es wird sogar ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg angeschaltet, der zum programmierten Zelltod führt *[Liu, Y. et al., 1992b, Müller, D.L. et al., 1989, Noel, P.J. et al., 1996b, Schwartz, R.H., 1990]*. Somit wird verhindert, daß autoreaktive T-Zellen allein über das Antigen, das ihr TZR erkennt, aktiviert werden können.

In vitro kann die T-Zellaktivierung durch eine Vielzahl von Reagenzien erfolgen. Bei einigen dieser Reagenzien ist die Struktur, an der sie angreifen und zur T-Zellaktivierung führen, bekannt: Phorbolester wie Phorbol-myristat-acetat (PMA) aktivieren die Proteinkinase C. Ca^{2+}-Ionophore wie das Ionomycin führen zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} *[Weiss, A., 1993]*. Zusammen gelingt es den beiden Reagenzien eine vollständige T-Zellaktivierung zu induzieren, wie sie in vivo durch Ligation des TZR und kostimulatorischer Moleküle erfolgt. Lectine wie Phytohämagglutinin P (PHA P) kreuzvernetzen Glykoproteine wie den TZR und führen dadurch zu einer T-Zellaktivierung.

Schließlich ist auch eine Aktivierung der T-Zellen durch spezifische monoklonale Antikörper (mAk) gegen den TZR oder das TZR-assoziierte CD3 Molekül möglich *[Weiss, A., 1993]*. Andere Reagenzien inhibieren die Signaltransduktionswege der T-Zellaktivierung wie z.B. das Cyclosporin A (CsA). CsA inhibiert spezifisch die Ca^{2+}/Calmodulin abhängige Phosphatase Calcineurin, die in den Signalweg eingeschaltet ist, der nach Ligation des TZR induziert wird. Die Anwendung dieser Reagenzien ermöglicht es, genauer zu definieren durch welche Signalwege die Expression eines Moleküls reguliert wird. Außerdem ist die Abhängigkeit der Expression der T-Zellaktivierungsantigene von einem Signal (nur PMA oder Ionomycin) oder zwei Signalen ein wichtiges Unterscheidungskriterium, das es ermöglicht, die T-Zellaktivierungsantigene in zwei Gruppen zu unterteilen. Einige T-Zellaktivierungsmoleküle, wie z.B. CD40 Ligand (L), benötigen für eine vollständige Induktion die Wirkung beider Reagenzien zusammen, ihre Induktion ist also stringenter reguliert als die Expression der Moleküle der einsignalabhängigen Gruppe, zu denen z.B. CD69 gehört *[Lopez-Cabrera, M. et al., 1993]*.

Die Aktivierung der T-Zelle stellt allerdings nur einen der ersten Schritte im Laufe einer Immunreaktion dar. Die Aktivierung und Differenzierung der anderen Zellen des Immunsystems wird im folgenden von den $CD4^+$-T-Zellen mit ihren Signalmolekülen dirigiert. Dadurch wird gewährleistet, daß eine koordinierte Aktivierung und das Zusammenwirken von Makrophagen, B-Zellen, "natürlichen killer-Zellen" (NK-Zellen) und $CD8^+$-Zellen erfolgt.

Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Molekül ICOS (= "inducible costimulator") stellt eines der Moleküle innerhalb dieses komplexen Signalnetzwerks dar. Dafür sprechen eine Reihe von Befunden, die zu Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit bereits bekannt waren: ICOS ist ein T-Zellspezifisches Aktivierungsmolekül. Untersuchungen der Expression des Moleküls in Zellinien und primären Zellen rechtfertigen die Bezeichnung „T-Zellspezifisch“, da, abgesehen von den T-Zellen, keine der untersuchten Zellpopulationen das Molekül exprimiert. T-Zellen exprimieren ICOS nach ihrer Aktivierung, $CD4^+$-Zellen allerdings deutlich schneller als $CD8^+$-Zellen. Vergleiche mit anderen T-Zellaktivierungsmolekülen zeigen bis heute keine signifikante Übereinstimmung im Expressionsmuster von ICOS mit bekannten T-Zellaktivierungsmolekülen, so daß angenommen werden muß, daß es sich bei ICOS um ein neues T-Zellaktivierungsmolekül handelt.

Bis jetzt ist das Molekül nur durch einen monoklonalen Antikörper darstellbar. Dieser Antikörper (Ak) (mAK F44) wird von einem Hybridom produziert, das einer Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen einer Maus, die mit aktivierten T-Zellen immunisiert wurde, entstammt. Immunpräzipitationen mit dem mAk F44 und anschließende Analyse mittels Gelelektrophorese zeigen, daß ICOS im nicht-reduzierten Zustand ein Dimer darstellt, dessen Bestandteile über Disulfidbrücken verbunden sind und ein Molekulargewicht von 29 bzw. 27 Kilo Dalton haben.

Histologische Untersuchungen von primärem und sekundärem lymphatischem Gewebe sowie von lymphatischen Neoplasien zeigten ein sehr spezifisches Expressionsmuster von ICOS. Die Expression des ICOS Moleküls ist fast ausschließlich auf die helle Zone der Keimzentren des sekundären lymphatischen Gewebes beschränkt. Durchflußzytometrische Analysen der T-Zellen aus sekundärem lymphatischen Gewebe zeigen, daß innerhalb dieser Zellpopulation ca. 50-80% der

Zellen ICOS$^+$ sind. Im Knochenmark und Thymus des älteren Erwachsenen wird ICOS nicht exprimiert. Die Helle Zone des Keimzentrums, der Bereich der Hauptexpression des ICOS Moleküls, besteht aus den Zentrozyten, d.h. B-Zellen, follikulär dendritischen Zellen (FDC) und T-Zellen *[McLennan, I.C.M. et al., 1994]*. In diesem Bereich findet eine positive Selektion, Proliferation und Differenzierung derjenigen B-Zellen statt, die nach Hypermutation die Immunglobuline (Ig) exprimieren, die die stärkste Affinität zum Immunantwort auslösenden Ag zeigen *[Kelsoe, G., 1996]*. Dies erfolgt einerseits über die Präsentation von Ag durch das enge Netzwerk von FDC, andererseits auch über T-Zelloberflächenstrukturen, wie z.B. CD40L. Zusammen verhindern Ag und T-Zelloberflächenstrukturen, daß die B-Zellen den Weg der Apoptose einschlagen *[Koopman, G. et al., 1994, Liu, Y.-J. et al., 1989]* (Zusammenfassungen der Prozesse z. B. in *Clark, E.A. et al, 1991*, *Grouard, G. et al., 1995*, *McLennan, I.C.M. et al., 1997* und *Parker, D.C., 1993*). Zahlreiche Versuche und genetische Aberrationen unterstreichen die entscheidende Rolle, die die Interaktion von CD40 mit CD40L für die Regulation *[Garonne, P. et al., 1995, Lagresle, C. et al., 1995, Schattner, E.J. et al., 1995]* bzw. Rettung vor Apoptose *[Lederman, S. et al., 1994, Liu, Y.-J. et al, 1989]*, Proliferation *[Nishioka, Y. et al., 1994, Kwekkeboom, J. et al., 1994]*, Immunglobulinklassenwechsel *[Lederman, S. et al., 1994, Oxenius, A. et al., 1996]*, Immunglobulinsekretion *[Kwekkeboom, J. et al, 1994, Lederman, S. et al., 1992, Splawski, J. et al., 1993]* und Entdifferenzierung *[Arpin, C. et al., 1995, Gray, D. et al., 1996]* der B-Zelle spielt *[Banchereau et al., 1994]*. Einige dieser Versuche zeigen allerdings auch, daß dieses Rezeptor-Ligandpaar nicht allein für die Vorgänge bei der Entwicklung im Keimzentrum verantwortlich ist, sondern, daß noch weitere, bisher unbekannte Signalmoleküle existieren müssen, die die Entwicklung der B-Zelle durch die T-Zellhilfe steuern *[Kwekkeboom, J. et al, 1994, MacLennan, I.C.M. et al., 1997, Nishioka, Y. et al., 1994]*. Diese Untersuchungen sind v.a. im Anbetracht des ICOS-Expressionsmusters überaus interessant, da sie eine mögliche Funktion von ICOS nahelegen.

Erste Befunde zur Funktion von ICOS bestanden bereits zu Beginn der Arbeit: Bezüglich des Parameters "Proliferation" konnte gezeigt werden, daß ICOS ein kostimulatorisches Molekül ist. Als kostimulatorische Moleküle werden solche Moleküle bezeichnet, die in der Lage sind, bestimmte Zellaktivierungsparameter zu induzieren bzw. hochzuregulieren, wenn diese Parameter durch suboptimale Stimulation über den TZR alleine nicht oder nur schwach induziert werden. Dies ist von besonderer Relevanz, da in vivo die Antigenkonzentration den limitierenden Parameter für die Aktivierung der T-Zellen darstellt. Dadurch ist in vivo die zusätzliche Ligation eines kostimulatorischen Moleküls notwendig, um einen Schwellenwert zu überschreiten, der zur Aktivierung der T-Zelle führt. Die Liste derjenigen Moleküle, die in der Lage sind, Kostimulation auszuüben, ist in den letzten Jahren stark gewachsen. Es zählen hierzu: CD5 *[Alberola-Ila, J. et al., 1992]*, CD26 *[Dang, N.H. et al., 1990]*, CD27 *[Kobata, T. et al., 1994]*, CD28 *[Baroja, M.L. et al., 1989]*, CD69 *[Cebrián, M. et al., 1988]* und eine Reihe anderer Moleküle (Aufzählung in *Kuiper, H.M. et al., 1995* und *Liu, Y. et al., 1992b*). Allerdings ist für die meisten Moleküle nur untersucht worden, ob sie die Wirkung der Ligation des TZRs bezüglich der Proliferation und z.T. der Zytokinsekretion verstärken können. Am genauesten bezüglich der kostimulatorischen Funktion wurde bis jetzt das CD28 Molekül untersucht. Unter anderem werden durch Kostimulation über das CD28 Molekül die T-Zellproliferation und eine Reihe von Zytokinen induziert, die T-Zellhilfe für APCs gesteigert und die T-Zellanergie verhindert

(Zusammengefaßt z.B. in *Lenschow, D.J., 1996* und *Linsley, P.S. et al., 1993*).

Allerdings ist bis jetzt keine befriedigende Erklärung gefunden worden, warum eine Vielfalt von kostimulatorischen Moleküle existiert, die scheinbar identische Aufgaben erfüllen. Die in vivo-Funktion der bereits bekannten kostimulatorischen Moleküle bleibt oft unklar, da in vitro-Versuche häufig eine funktionelle Redundanz zeigen; die Ursache, warum anscheinend redundante Moleküle exprimiert werden, aber nicht genau geklärt wird. Viele dieser Moleküle werden gewebsspezifisch oder aktivierungsabhängig exprimiert, was darauf hindeutet, daß durch diese Vielfalt eine Feinregulation der Kostimulation erreicht wird. Trotz dieser Vorstellung werden die Details dieser Feinregulation und das Zusammenspiel der Moleküle nur schlecht verstanden. Die vorliegende Arbeit charakterisiert eine Reihe von Parametern, die von ICOS kostimulatorisch beeinflußt werden. Sie zeigt auf, wo Gemeinsamkeiten mit anderen kostimulatorischen Molekülen bestehen. Andererseits verdeutlichen die Ergebnisse aber auch, daß zumindest für dieses Molekül, die oftmals beschriebene Redundanz nur bedingt zutrifft, da durch das ICOS Molekül auch Effekte ausgelöst werden, die in dieser Weise bis jetzt nicht für andere Moleküle beschrieben worden sind. Möglicherweise kann die Aufklärung der durch das ICOS Molekül ausgelösten Wirkungen helfen, das Phänomen der Kostimulation besser zu verstehen. Für die Funktion von T-Zellen als „Dirigenten“ der Immunantwort und als Effektorzellen ist ihre Aktivierung durch Kostimulation essentiell. Die Charakterisierung des kostimulatorisch wirkenden ICOS Moleküls kann daher zur Aufklärung des komplexen Kommunikationsnetzwerks des Immunsystems beitragen und es somit ermöglichen, die physiologischen und pathologischen Vorgänge des Immunsystems besser zu verstehen.

3 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten im wesentlichen zwei Aspekte des ICOS Moleküls näher charakterisiert werden: die Induktionsbedingungen und die Funktion. Bezüglich der Induktionsbedingungen sollten im einzelnen folgende Fragestellungen adressiert werden:

1.Durch welche Stimuli kann die Expression des ICOS Moleküls induziert werden?

2.Wie verläuft die Kinetik der Expression bei unterschiedlichen Stimulationsbedingungen?

3.Ist die Expression des ICOS Moleküls ein- oder zweisignalabhängig?

4. Wie verläuft die Kinetik der Expression des ICOS Moleküls im Vergleich zur Expressionskinetik der bekannten Aktivierungsantigene CD25, CD40L und CD69?

Bezüglich der Funktion des ICOS Moleküls sollte untersucht werden, welche Effekte die Kostimulation über das ICOS Molekül bewirkt. Dabei sollten die Wirkungen der Kostimulation via ICOS auf folgende kritische Parameter der T-Zellaktivierung analysiert werden:

1.Die Expression anderer Oberflächenmoleküle

2.Die Zytokinsekretion

3.Die T-Zellhilfe für B-Zellen

4.Die Induktion von Anergie.

Schließlich sollte untersucht werden, ob die Blockade der ICOS Interaktion mit dem ICOS spezifischen mAk F44, Auswirkungen auf die T-Zellvermittelte B-Zellhilfe hat.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien und Reagenzien

Nicht erwähnte Materialien, Reagenzien und Geräte entsprechen denjenigen, die in der Laborroutine in einem medizinisch-naturwissenschaftlich arbeitenden Labor verwandt werden und bei entsprechenden Firmen zu beziehen sind. Das gleiche gilt für Lösungen und Reagenzien, deren Zusammensetzung nicht näher erläutert wird. Alle Reagenzien wurden wie vom Hersteller angegeben gelöst/verdünnt und gelagert.

4.1.1 Reagenzien für ELISAs

4.1.1.1 Antikörper

Antikörperpaar zur Bestimmung von Humanes (Hu) IFN-γ (ein Ak biotinyliert)	Medgenix über Biosource, Fleurus, Belgien
Anti-hu IgG	Tago-Immunologicals, Camarillo, CA, USA
Anti-hu IgM	Tago-Immunologicals, Camarillo, CA, USA
Antikörperpaar zur Bestimmung von hu IL-2 (ein Ak biotinyliert)	Endogen, Cambridge, MA, USA
Antikörperpaar zur Bestimmung von hu IL-4 (ein Ak biotinyliert)	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Antikörperpaar zur Bestimmung von hu IL-5 (ein Ak biotinyliert)	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Anti-hu Immunglobulin (biotinyliert)	Tago-Immunologicals, Camarillo, CA, USA

4.1.1.2 Standards

IFN-γ (hu rekombinantes (r) IFN-γ)	Medgenix über Biosource, Fleurus, Belgien
IgG (hu)	Sigma, St. Louis, MS, USA
IgM (hu)	Sigma, St. Louis, MS, USA

IL-2 (hu rIL-2)	Peprotech, London, Großbritannien
IL-4 (hu rIL-4)	Pharmingen, San Diego, CA, USA
IL-5 (hu rIL-5)	Pharmingen, San Diego, CA, USA

4.1.2 Antikörper und Sekundärreagenzien für die Durchflußzytometrie

4.1.2.1 Antikörper

Die Anmerkung „Hybridom“ bedeutet, daß der Antikörper durch ein laboreigenes Hybridom produziert und im Labor aufgereinigt wurde. Wenn nicht anders angegeben, stammen die Ak aus der Maus und sind gegen hu Moleküle gerichtet. Ak OKT3 und 9.3 wurden als Aszites, sonstige Ak im aufgereinigten Zustand verwendet.

Klon	**Spezifität**	**Markierung**	**bezogen durch:**
2A11	Isotyp	-	Hybridom
2A11	Isotyp	FITC	Hybridom
63D3	CD14	-	ATCC-Hybridom
7G7B6	CD25	-	ATCC-Hybridom
F44	ICOS	-	Hybridom
F44	ICOS	FITC	Hybridom
91d6	CD4	-	ATCC-Hybridom
9.3 *[Baroja, M.L. et al., 1989]*	CD28	-	freundlicherweise von Immunex, Seattle zu Verfügung gestellt
B1.49.9	CD25	FITC	Coulter-Immunotech, Hamburg
B73.1	CD16	-	Hybridom
BU12	CD19	-	Hybridom
FN50	CD69	-	4th international workshop of leucocyte typing
G28-5	CD40	-	ATCC-Hybridom
H1B19	CD19	CyChrome	Pharmingen, San Diego, CA, USA
MOPC-21	Isotyp	-	Sigma, St. Louis, MS, USA
OKM1	CD11b	-	ATCC-Hybridom
OKT8	CD8	-	ATCC-Hybridom

SK1	CD8	FITC	Becton Dickinson, San José, CA, USA
SK3	CD4	FITC	Becton Dickinson, San José; CA, USA
TRAP-1	CD40L	-	Hybridom
TRAP-1	CD40L	FITC	Hybridom
UCHT-1	CD3	FITC	Serotec, Wiesbaden
UCHT-1	CD3	PE	Pharmingen, San Diego, CA, USA
UCHT-1	CD3	CyChrome	Pharmingen, San Diego, CA, USA

4.1.2.2 Sekundärreagenzien und -antikörper:

Reagens	**Spezifität**	**Markierung**	**bezogen durch:**
Antiserum	anti-maus IgG	FITC	Caltag, San Francisco, CA, USA
Antiserum	anti-maus IgG-Fab-Fragment	FITC	Jackson, West Grove, CA, USA
Streptavidin	bindet an Biotin	FITC	Jackson, West Grove, CA, USA
Streptavidin	bindet an Biotin	PE	Jackson, West Grove, CA, USA

4.2 Zellpräparation

Alle Arbeiten (bis auf 4.2.1) wurden steril ausgeführt.

4.2.1 Zellzählung

Die Zellen wurden nach Mischung mit einer 0,001% Trypanblaulösung (Biochrom, Berlin) gezählt, um vitale von nicht vitalen Zellen zu diskriminieren. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

4.2.2 Präparation von „Nylon-T-Zellen“

Die Präparation von sogenannten „Nylon-T-Zellen“ (NTZ) erfolgte aus „buffy coats“ von gesunden Spendern, die aus der Blutbank des UKRV sowie von Mitarbeitern aus dem Labor stammten. Durch Dichtegradientenzentrifugation über eine Ficoll-Lösung (Biochrom, Berlin) wurde aus diesen „buffy coats“ eine Interphase isoliert, die die peripheren mononukleären Zellen enthält. Darauffolgendes zweimaliges Waschen mit PBS diente dazu, Zelltrümmer und Thrombozyten zu entfernen. Die Zellen wurden dann durch eine Passage über mit Nylonwolle (Bibby Dunn, Asbach) gestopften Spritzen von

den Monozyten und B-Zellen befreit. Die durch diese Methode gewonnen Zellen wurden jedesmal durchflußzytometrisch auf ihren T-Zellanteil untersucht, wobei als Maß der prozentuale Anteil an $CD3^+$-Zellen galt, der immer zwischen 85% und 95% lag. Die beschriebene Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an *Boyum, A., 1968* und *Eisen, S.A. et al., 1972*.

4.2.3 Aufreinigung von $CD4^+$,$CD8^-$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen

Um für bestimmte Fragestellungen eine besser definierte Zellpopulation zu erhalten, wurden die Nylon-T-Zellen in weitere Untergruppen separiert. Durch geeignete Ak wurden $CD4^+$-T Zellen erhalten, indem NK-Zellen, B-Zellen, $CD8^+$-Zellen und Monozyten mit Hilfe dieser Ak entfernt wurden. Für andere Versuche wurden $CD8^-$-Zellen hergestellt, indem die $CD8^+$-Zellen entfernt wurden (für die in 5.2.2.3 beschriebenen Experimente) oder $CD8^+$-Zellen angereichert, indem NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten und $CD4^+$--Zellen entfernt wurden. Diese Isolation erfolgte in Anlehnung an *Manyonada, I.T. et al., 1992*. Exemplarisch wird im folgenden die Aufreinigung der $CD4^+$-Zellen beschrieben. Die Vorgehensweise war für die Aufreinigung der beiden anderen Zellpopulationen identisch, abgesehen davon, daß entsprechend andere Antikörper verwandt wurden. Die Nylon-T-Zellen wurden sofort weiterverarbeitet. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt, um eine Internalisierung oder ein Abschneiden der Oberflächenantigene zu verhindern. Zu der Zellösung wurden zunächst folgende Antikörper hinzugegeben: OKM-1, L243, OKT8, BU12 und, nach einer dreißigminütigen Inkubation sowie zwei Waschschritten, die mit Ziege-anti-Maus Antikörper beschichteten Magnetpartikel (=Dynabeads) (Ziege-anti-Maus, Dynal, Oslo, Norwegen) dazu gegeben. Die Zellen wurden erneut 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die magnetische Entfernung derjenigen Zellen, die die oben beschriebenen Antikörper und dementsprechend die Magnetpartikel gebunden hatten, durch einen Magnethalter (Dynal MCP 6^R Magnethalter, Dynal, Hamburg). Der Erfolg der Aufreinigung wurde jedesmal durchflußzytometrisch überprüft, wobei die eingesetzten Zellen durchschnittlich zu 92-98% aus $CD4^+$-Zellen bestanden, bzw. keine $CD8^+$-Zellen mehr nachweisbar waren. Die Reinheit der $CD8^+$-Zellen betrug im dargestellten Experiment (5.2.2.2.5) 93% $CD8^+$-Zellen.

4.2.4 Mitomycin-Behandlung

Um eine Proliferation von Zellen zu verhindern, ist es möglich, deren DNA durch Kreuzvernetzung mit Mitomycin der Replikation unzugänglich zu machen. Dies wird u.a. notwendig, wenn die durch T-Zellen induzierte Immunglobulinsekretion von B-Zellen untersucht werden soll *[Hirohata, S. et al., 1993]*. Die Zellen wurden für 40 Minuten in einer 0,05 µg/ml Mitomycin Lösung (Sigma, St. Louis, MS, USA) bei 37° C inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubationsdauer bei 37° C war austitriert worden und stellt einen Kompromiß aus Hemmung der Proliferation und Zellschädigung durch das Mitomycin dar.

4.2.5 Präparation von tonsillären B-Zellen

Aufgrund der einfachen Zugänglichkeit und des hohen B-Zellanteils wurden die benötigten B-Zellen aus Tonsillen (Tonsilla palatina) extrahiert. Diese Tonsillen stammten von Spendern (Alter 4-28 Jahre), denen die Tonsillen aufgrund typischer medizinischer Indikationen (rezidivierende Tonsillitiden) entnommen wurden, die ansonsten aber gesund waren. Die Tonsillen wurden nach ihrer Entnahme sofort in Zellkulturmedium (R10F+) (RPMI 1640 Medium mit 10% (v/v) FCS, 50 U/ml Penicillin,

25 µg/ml Streptomycin) gelegt und auf Eis zum Labor transportiert. Das beschriebene Verfahren entspricht der Vorgehensweise in *Splawski., J. et al., 1991* mit einigen Modifikationen.

4.2.5.1 Aufreinigung von tonsillären B-Zellen

Alle nachfolgenden Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt, um die sehr empfindliche B-Zellpopulation *[Liu, Y.-J. et al., 1989]* zu schützen. Die Tonsillen wurden mit Skalpell und Schere von Fett- und Bindegewebe befreit. Das angereicherte lymphatische Gewebe wurde durch 2 Edelstahlsiebe hindurchgedrückt (Prüfsiebe à 500 und 212 µm Maschenweite, bezogen über Werkstätte für Chemie und Photo, Berlin), um eine Einzell-Zellsuspension zu erhalten. Aus dieser Zellsuspension wurde wie in 4.2.2 beschrieben eine Interphase isoliert. Anschließend erfolgte die Depletion von T-Zellen durch Rosettierung mit Schafserythrozyten. Dazu wurden die mononukleären Zellen pelletiert, in der Schafserythrozytenlösung (Herstellung der Schafserythrozytenlösung s.u.) inkubiert und zur Verbesserung der CD2-CD58-Homolog-Bindung aufeinander zentrifugiert. Nach vorsichtiger Lösung des Zellpellets in PBS wurde aus der Lösung eine Interphase isoliert (wie in 4.2.2), die die B-Zellen enthält, da die T-Zellen – an die Schafserythrozyten gebunden – pelletiert werden. Der Anteil an $CD19^{+}$-Zellen (B-Zellen) betrug regelmäßig zwischen 90% und 98%.

4.2.5.2 Präparation einer Schafserythrozytensuspension für die Depletion von T-Zellen

Das Schafsblut stammte aus der Versuchstierhaltung in Berlin, Marienfelde. Als anti-Koagualans wurde dem Schafsblut bei der Entnahme Citratlösung (3,13 %, Verhältnis Blut zu Citratlösung 10:1 v/v) hinzugesetzt. Das aus dem Schafsblut durch Zentrifugation gewonnene Erythrozytenpellet wurde in 0,2 M Ammoniumethylisothiouroniumbromid (Sigma, St. Louis, MS, USA), pH 9 gelöst und 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurde aus dem Zellpellet eine 5% Lösung in R10F+ hergestellt, die bei 4° C bis zu vier Wochen gelagert wurde. Durch diese Präparation wird auf den Schafserythrozyten ein dem CD58 homologes Ag stabil freigelegt, so daß es das CD2 Antigen der T-Zellen binden kann.

4.3 Stimulation von Zellen

Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37° C, 5% $C0_2$. Die Inkubationsdauer ist bei den jeweiligen Experimenten vermerkt.

4.3.1 Stimulation von T-Zellen

4.3.1.1 Stimulation mit PMA und/oder Ionomycin

Die Präparation der Reagenzien erfolgte unmittelbar vor ihrem Einsatz. Um eine gute Lösung der hydrophoben Reagenzien PMA und Ionomycin (beide: Sigma, St. Louis, MS, USA) zu erreichen, wurden die Reagenzien zunächst in einem, im Vergleich zum Endvolumen der Zellsuspension, kleinen Volumen Zellkulturmedium ohne FCS (Vermeidung der Bindung der lipophilen Reagenzien an FCS) gelöst und unmittelbar darauf zur Zellsuspension gegeben und die Zellen dann in die Zellkulturflaschen/-platten gebracht. Sollte der durch PMA und Ionomycin ausgelöste Signaltransduktionsweg blockiert werden, wurde dem kleinen Volumen Zellkulturmedium neben PMA und Ionomycin noch Cyclosporin A (CsA) (Sandoz, Nürnberg) hinzugefügt. Die Endkonzentration des

PMA betrug in allen Versuchen, in denen keine anderen Angaben gemacht werden, 33 ng/ml, die Endkonzentration des Ionomycin 200 ng/ml, die Endkonzentration des CsA betrug 1 µg/ml. Die Dichte der Zellen betrug in allen Experimenten (sofern keine anderen Angaben gemacht werden) $1x10^6$/ml.

4.3.1.2 Stimulation mit PHA P

Das PHA P (Difco, Detroit, MI, USA) wurde in einer Endkonzentration von 1,25 µg/ml eingesetzt. Die für das Zellsuspensionsvolumen erforderliche Menge wurde diesem zugesetzt und die Suspension dann in die erforderlichen Zellkulturplatten/-gefäße gebracht. Die verwendete Konzentration war in Vorexperimenten austitriert worden. Die Dichte der Zellen betrug in allen Experimenten (sofern keine anderen Angaben gemacht werden) $1x10^6$/ml.

4.3.1.3 Stimulation durch immobilisierte Antikörper

Die Immobilisation der Ak erfolgte nach *Kruisbeek, A.M. et al., 1991*. Die erforderliche Menge an Ak wurde für jeden Ak austitriert, abhängig vom Effekt, der erzielt werden sollte. Zunächst wurden 96-Loch Rundboden Platten (Nunc, Wiesbaden) mit einem unspezifischen anti-Maus Ak (anti-Maus IgG, Sigma, St. Louis, MS, USA) beschichtet (16 h bei 4° C, 50 µl Volumen/Vertiefung). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die stimulierenden Ak hinzupipettiert, ebenfalls in einem Volumen von 50 µl und wie der erste Ak inkubiert. Die Platten wurden erneut zweifach gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden 100 µl Medium (R10F+) in die Vertiefungen pipettiert. Die Zellen wurden sofort in ebenfalls 100 µl Volumen hinzupipettiert. Für 24-Loch (Nunc, Wiesbaden) Platten betrugen die Antikörpervolumina 300 µl. Sollte mehr als ein Ak immobilisiert werden, dann wurden die Ak, bevor sie in die Löcher pipettiert wurden, gemischt, damit beide Ak parallel immobilisiert werden konnten. Die Dichte der Zellen ist bei den entsprechenden Experimenten vermerkt.

4.3.2 Stimulation von B-Zellen

Die Stimulation von B-Zellen erfolgte in allen Versuchen durch stimulierte T-Zellen. Die Vorgehensweise entsprach dabei den Arbeiten von *Lagresle, C. et al., 1994* und *Lipsky, P.E., 1990*. Die Zellen wurden in 96-Loch Zellkulturplatten stimuliert. Die T-Zellen waren jeweils am Vortrag präpariert worden und in einer Konzentration von 2×10^6/ml in R10F+ in Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) im Brutschrank inkubiert worden. Die B-Zellen wurden unmittelbar vor der Stimulation isoliert. Die Zellen wurden gemischt, so daß sich in einem Volumen von 100 µl die für das Experiment vorgesehene Menge/Vertiefung befand. Für die Stimulation durch anti-CD3 Ak stimulierte T-Zellen wurden pro Vertiefung 50 000 T-Zellen und 25 000 B-Zellen in die Vertiefungen pipettiert. Für die Stimulation durch PHA P stimulierte T-Zellen wurden 50 000 T-Zellen und 50 000 B-Zellen in jedes Loch gebracht. Die notwendige Menge des PHA P war in Vorexperimenten austitriert worden und wurde den bereits gemischten Zellpopulationen unmittelbar vor dem Einbringen in die Vertiefungen zugesetzt.

4.4 Proliferationsassay

Die Proliferation der Zellen wurde über den Einbau an ^{3}[H]-markiertem Thymidin (ICN, Eschwege) gemessen. 16 Stunden bevor die Kultur beendet werden sollte, wurde den Zellen in der 96-Loch Zellkulturplatte, pro Loch 1 µCi ^{3}[H]-Thymidin zugesetzt. Die Zugabe erfolgte steril und die Zellen wurden anschließend im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe des Zellerntegeräts (PHD Cell Harvester, Dunn Labortechnik, Asbach) wurden die Zellen aus ihren Löchern auf Glaswollfilter gebracht. Die Glaswollfilterteile, die einem Loch entsprachen, wurden ausgestanzt, in Szintillationsröhrchen überführt und getrocknet. Anschließend wurde ihnen Szintillationsflüssigkeit zugesetzt und die verursachte Szintillation in einem ß-Counter (LS 1801 Szintillationszähler, Beckmann, München) gemessen. Als Maß für die Proliferation gelten die gezählten Ereignisse pro Minute (cpm). In den Experimenten entspricht dies der Angabe "Thymidin Einbau".

4.5 Enzymimmunoassays (ELISA) zur Bestimmung von löslichen Proteinen im Zellkulturüberstand

Alle Zellkulturüberstände wurden zum (bei den jeweiligen Experimenten) vermerkten Zeitpunkt geerntet, indem die Zellen abzentrifugiert und die Überstände abpipettiert wurden, und bei -80° C gelagert. Sofern nötig, wurden sie mit R10F+ verdünnt, um Absorptionswerte im linearen Bereich der Standardkurve zu erhalten. Die hierfür notwendige Verdünnung wurde austitriert. Die Konzentration des Erst- und Zweitantikörpers sowie der Konzentrationsbereich der Standardreihe waren ebenfalls in Vorexperimenten analog zu *Porstmann, T. et al., 1992* austitriert worden. Die Verdünnung der Standardreihe erfolgte in dem Zellkulturmedium, das auch für die Gewinnung der Überstände eingesetzt worden war (R10F+).

4.5.1 Standardprotokoll eines Sandwich-ELISA

Im folgenden wird am Beispiel der Bestimmung von sezerniertem IgG oder IgM ein Standardprotokoll für einen Sandwich-ELISA dargestellt. Anschließend erfolgt eine Auflistung der Abweichungen von diesem Standardprotokoll bei den anderen angewendeten ELISAs. Die Verdünnungen der Erst- und Zweitantikörper wurden für alle ELISAs gemäß *Porstmann, T. et al., 1992* austitriert.

Die Bestimmung erfolgte auf 96-Loch Flachbodenplatten mit verstärkter Proteinbindungskapazität (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden). Die Erstantikörper, die IgM detektieren, wurden in PBS verdünnt, die Antikörper, die IgG detektieren in $NaHCO_3$-Puffer (0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,0) verdünnt und in einem Volumen von 50 µl/Vertiefung auf die Platte pipettiert, die Platten dann mindestens 16 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Platte mit 200 µl Blockade-Puffer (PBS/3% (w/v) BSA) (BSA: Sigma, St. Louis, MS; USA) geblockt, die Platten dafür eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die Platten wurden dann zweifach mit Waschpuffer (PBS/0,05% (v/v) Tween 20) (Tween 20: Sigma, St. Louis, MS, USA) gewaschen. 100 µl der Zellkulturüberstände (Proben), einer Standardverdünnungsreihe von hu IgM bzw. IgG sowie Zellkulturmedium (R10F+) als Leerwert wurden als Doppelwerte auf die Platte aufgetragen und 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach fünf Waschschritten wurden 100 µl des biotinylierten Zweitantikörpers (verdünnt in PBS/5% (v/v) FCS) in jede Vertiefung pipettiert und erneut

zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Platten sechs Mal gewaschen und 100 µl Streptavidin-Peroxidase (Jackson, West Grove, CA, USA für IL-2 und Ig-ELISAs, Calbiochem, La Jolla, CA, USA für alle anderen ELISAs) (verdünnt in PBS/5% (v/v) FCS) in jedes Loch gegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° C sowie sechs Waschschritten, wurde der ELISA entwickelt. Als Substrat wurde eine TMB-Lösung hergestellt (1 Tablette TMB (Sigma, St. Louis, MS, USA) in 10 ml Substrat-Puffer (0,05 M Phosphat-Citrat Puffer, pH 5,0) gelöst), zu der 2 µl 30% H_2O_2 gegeben wurden. Das aufgetragene Volumen betrug 100 µl/Vertiefung. Sobald eine deutliche Abstufung in der Farbentwicklung der Standardreihe zu erkennen war, wurde die Reaktion mit 100 µl 1 M H_2SO_4 beendet und die Absorption im ELISA-Meßgerät (Dynatech Laboratories, Denkendorf) bei 450 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 630 nm) gemessen. Die Nachweisgrenzen der ELISAs lagen bei: IgG ELISA: <0,3 ng/ml, IgM ELISA: <1,25 ng/ml.

4.5.2 Abweichungen vom Standardprotokoll bei den anderen ELISAs

IL-2 ELISA: Der 1. Antikörper wurde in 100 µl Volumen/Vertiefung aufgebracht, der 2. Antikörper in 50 µl Volumen/Vertiefung. Zweitantikörper und Proben, Standards und Leerwerte (in 50 µl Volumen) wurden zusammen inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Der Blockade-Puffer bestand aus PBS/4% BSA (w/v). Die Waschlösung bestand aus 50 mM Tris/0,2% Tween 20 (v/v). Die Nachweisgrenze des ELISAs lag bei <0,625 ng/ml.

IFN-γ ELISA: Inkubation des 1. Antikörpers: 2 h bei 37° C. Es wurden Rundbodenplatten (Nunc, Wiesbaden) verwendet. Standards, Proben und Leerwert wurden in einem Volumen von 50 µl hinzupipettiert und 16 h bei 4° C inkubiert. Die für den 2. Antikörper vorgesehene Inkubation dauerte 2 h bei Raumtemperatur. Zum Entwickeln wurde die TMB-Lösung (240 mg TMB/ 10 ml DMSO-Ethanol Gemisch, Verhältnis DMSO/Ethanol 1/1) 1/100 in Gallati-Puffer (0,2 M Citratpuffer mit 0,03%H_2O_2 (v/v), pH 3,95) verdünnt (TMB-Pulver: Fluka, Buchs, Schweiz). Diese Substratlösung wurde auch für den IL-4 und IL-5 ELISA verwandt. Die Nachweisgrenze des ELISAs lag bei <30 pg/ml.

IL-5 ELISA: Inkubation des 2. Antikörpers für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die Nachweisgrenze des ELISAs lag bei <60 pg/ml.

Für den IL-4, -5 und IFN-γ ELISA wurden Rund- statt Flachbodenplatten verwendet.

Die Nachweisgrenzen der anderen ELISAs lagen bei: IL-4 ELISA: <16 pg/ml, ATAC ELISA: <1 pg/ml.

4.6 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie wurde benutzt, um die Expression von Oberflächenantigenen auf

Zellpopulationen zu untersuchen. Mit Hilfe des Durchflußzytometriegerätes können durch Lichtstreuung Aussagen über Zellgröße und -granularität getroffen werden, sowie durch die von den Fluoreszenzfarbstoffen ausgesendeten Strahlen unterschiedlicher Wellenlänge Aussagen über die Expressionsdichte der analysierten Oberflächenantigene und ihre prozentuale Verteilung innerhalb der untersuchten Zellpopulation gemacht werden. Zu diesem Zweck werden diese Oberflächenantigene durch mAk gebunden. Diese Ak sind entweder direkt mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert (=direkte Durchflußzytometrie/Färbung) oder der Ak, der das untersuchte Ag bindet, wird von einem weiteren Ak erkannt und gebunden. Dieser zweite Ak ist dann derjenige, der fluoreszenzmarkiert ist, so daß er vom Durchflußzytometriegerät detektiert werden kann (=indirekte Durchflußzytometrie/Färbung). Als dritte Möglichkeit bietet sich die Markierung des Oberflächenantigens durch einen biotinylierten spezifischen mAk an, an den in einem Folgeschritt fluoreszenzmarkiertes Streptavidin gebunden wird. Methodisch erfolgte eine Anlehnung an *Fleisher, T.A. et al., 1992* und *Melamed, M.R. et al., 1990*.

4.6.1 Anfärbung der Zellen

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Menge an Erst- und Zweitantikörper bzw. fluoreszenzmarkiertem Streptavidin wurden in Vorexperimenten austitriert. Die Waschschritte erfolgten mit FACS^R-PBS (PBS, 2,5% FCS (v/v) und 0,1% (w/v) NaN_3). Je nach Experiment wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch Rundbodenplatte zwischen 50 000 und 200 000 Zellen pro Loch pipettiert. Der erste Ak wurde in 50 µl Volumen zu den pelletierten Zellen dazupipettiert. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann zweimal gewaschen. Wurden direkt gekoppelte Ak verwendet, war die Färbung dann beendet und die Analyse erfolgte gemäß 4.6.2. Für indirekt gekoppelte Ak wurde anschließend der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper bzw. das fluoreszenzmarkierte Streptavidin in 50 µl Volumen hinzugegeben und die Zellen erneut 30 bzw. 15 Minuten (Streptavidin) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen gemäß 4.6.2 analysiert.

4.6.2 Analyse der angefärbten Zellen

Die Analyse erfolgte im FACSCalibur^R Gerät (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Bis unmittelbar vor der Analyse wurden die Zellen auf Eis gehalten. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in 150 µl FACS^R-PBS aufgenommen und unmittelbar vor der Analyse mit 150 µl FACS^R-sheath Flüssigkeit (0,9% NaCl-Lösung, 0,1% (w/v) NaN_3) gemischt oder mit 150 µl FACS^R-sheath Flüssigkeit gemischt, die mit 1 µg/ml Propidiumiodid versetzt war. Durch das Propidiumiodid ist es möglich, die Vitalität der Zellen zu beurteilen und somit nur vitale Zellen zu analysieren. Vor der eigentlichen Analyse erfolgte die für die Durchflußzytometrie übliche Einstellung des Geräts unter Eingrenzung der vitalen Lymphozytenpopulation aufgrund ihrer Größe und Granularität und Abgleich der Laserspannung der verwendeten Kanäle. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben, wobei mindestens 10 000 Zellen/Probe aufgenommen und für spätere Analysen bezüglich der Dichte und prozentualen Häufigkeit des Oberflächenantigens mit dem CellQuest^R-Programm (Becton Dickinson, San José, CA, USA) gespeichert wurden. Für jeden Typ Fluoreszenzfarbstoff wurde zudem als Negativ-Kontrolle eine Probe aufgenommen, die Zellen enthielt, die mit einem Ak angefärbt worden

waren, der kein Oberflächenantigen auf der eingesetzten Zellpopulation erkennt, so daß ein Maß für unspezifische Bindung und Eigenfluoreszenz der Zellen vorhanden war.

4.7 Herstellung und Analyse von $F(ab)_2$ Fragmenten

Um eine Bindung von Ak über ihren Fc-Teil zu verhindern, wurden in 5.2.2.4 $F(ab)_2$-Fragmente von Ak verwendet. Die Funktionalität der $F(ab)_2$-Fragmente wurde in der Durchflußzytometrie analysiert.

Es wurden aufgereinigte mAk, die in PBS gelöst waren, verwendet. Inkubationszeiten, pH-Werte und Konzentrationsverhältnisse wurden Ak-spezifisch vorher austitriert. Dabei wurde im wesentlichen wie in *Parham, E.M. et al., 1997* vorgegangen. Die Antikörperlösung wurde mit Hilfe von 1 M Citratpuffer und 1 M HCl auf einen pH von 3,5 oder 4,2 eingestellt. Die Pepsinlösung wurde in 0,1 M Citratpuffer hergestellt, in dem das Pepsin (Sigma, St. Louis, MS, USA) auf 1 mg/ml verdünnt wurde, der pH wurde auf 3,5 eingestellt. Die Pepsinlösung wurde zu der vorbereiteten Antikörperlösung hinzugegeben, das Verhältnis Pepsin-/Antikörperlösung betrug 1/70 (v/v). Die Lösung wurde bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Enzymaktivität durch Neutralisation mit 2 M Tris/HCl, pH 8,0 gehemmt. (Verhältnis Tris/HCl-Lösung zu Antikörperlösung 1/7) Der Ak wurde dann zwei Tage gegen PBS dialysiert. Sofern durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zu erkennen war, daß kein vollständiger Ak mehr vorhanden war und nur noch $F(ab)_2$ Fragmente übriggeblieben waren, wurde der dialysierte Ak auf 1 mg/ml eingestellt, sterilfiltriert und bei 4° C gelagert. Die SDS-PAGE erfolgte in 7,5% SDS-Polyacrylamid-Gelen (Ammoniumpersulfat, SDS, TEMED: Biorad, Hercules, CA, USA, Polyacrylamid: Roth, Karlsruhe) im BioRad Mini-Protean^R System (Biorad, Hercules, CA, USA). Es wurden mindestens 1 µg Gesamtprotein/Probe aufgetragen (berechnet durch ursprüngliche Antikörperkonzentration abzüglich der verdauten Fc-Fragmente). Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 80 V, dann bis zum Ende bei 150 V. Die Färbung der Proteine erfolgte durch Färbung mit Coomassieblau (0,1% Coomassieblau (v/v) in Coomassie-Entfärberlösung: 40% Ethanol, 10% Essigsäure) für 30 Minuten, dann erfolgte eine Entfärbung mit Entfärberlösung.

5 Ergebnisse

Alle Versuche wurden, sofern nicht anders angegeben, mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

5.1 Untersuchung der Induktionsbedingungen des ICOS Moleküls auf T-Lymphozyten

Um die Parameter näher zu definieren, die für die in vitro Expression von ICOS notwendig sind, wurden Zeitkinetiken durchgeführt. NTZ wurden mit verschiedenen Reagenzien stimuliert und zu den angegebenen Zeiten die Expression des ICOS Moleküls im Vergleich mit bekannten, gut charakterisierten T-Zellaktivierungsantigenen durchflußzytometrisch untersucht.

Die durchgeführten Experimente zeigten deutlich, daß für die Expression von ICOS zwei Signale notwendig sind. Die Stimulation mit PMA allein führte zu einer deutlich verringerten Expression, die mit Ionomycin hob sich kaum noch von der Negativkontrolle ab. Diese Beobachtungen sind in Abb. 1 deutlich zu erkennen. In seiner Zweisignalabhängigkeit ähnelt ICOS also anderen zweisignalabhängigen Molekülen wie in Abb. 2 exemplarisch für CD40L gezeigt. Einsignalabhängige Moleküle, wie hier am Beispiel von CD69 gezeigt, sind wesentlich weniger von der simultanen Wirkung von PMA und Ionomycin abhängig.

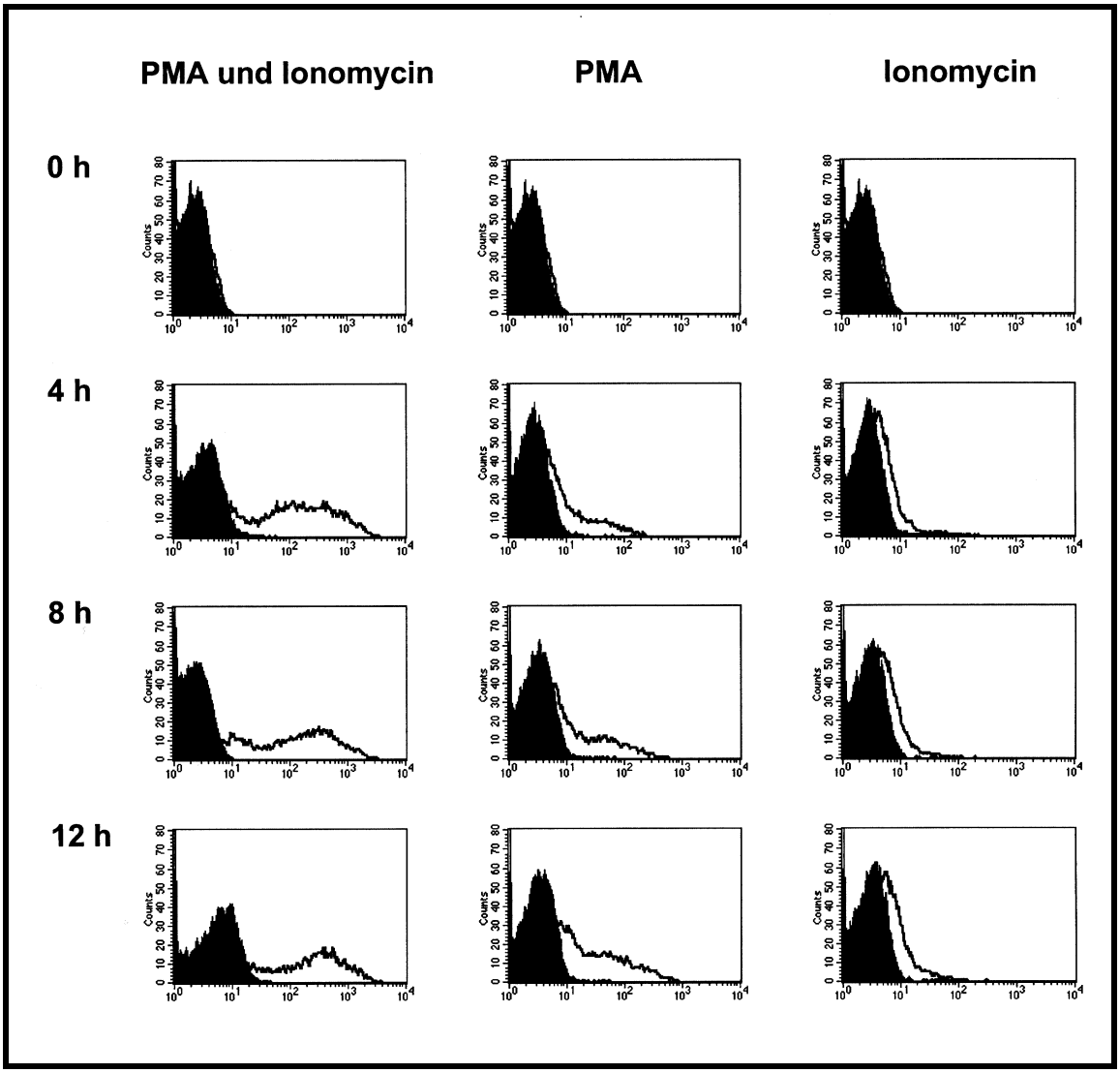

Abb. 1 **Zweisignalabhängigkeit des ICOS Moleküls.** Die Zellen wurden mit PMA (33ng/ml), Ionomycin (200ng/ml) oder PMA und Ionomycin in 24-Loch Flachbodenplatten stimuliert, zu den angegebenen Zeiten wurde die Oberflächenexpression von ICOS in der Durchflußzytometrie untersucht. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität des ICOS Moleküls (offene Linie) im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (schwarz). Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität dargestellt, auf der Y-Achse die Zellzahl.

Zusätzlich bestätigen die durch Stimulation mit PMA und Ionomycin erhaltenen Zeitkinetiken (Abb. 2) die Einordnung von ICOS in die Gruppe der frühen Aktivierungsantigene und ermöglichen es, das ICOS Molekül in die gut dokumentierte Expressionreihenfolge der Aktivierungsantigene dieser Gruppe einzuordnen *[Graf, D. et al., 1995, Holter, W. et al., 1985, López-Cabrera, M. et al., 1993]*: ICOS wird später als das früheste auf der Zelloberfläche exprimierte Aktivierungsantigen CD69 exprimiert. Die Anzahl der ICOS positiven Zellen ist nach 4 h mit 68% der prozentualen Expression von CD40L ähnlich.

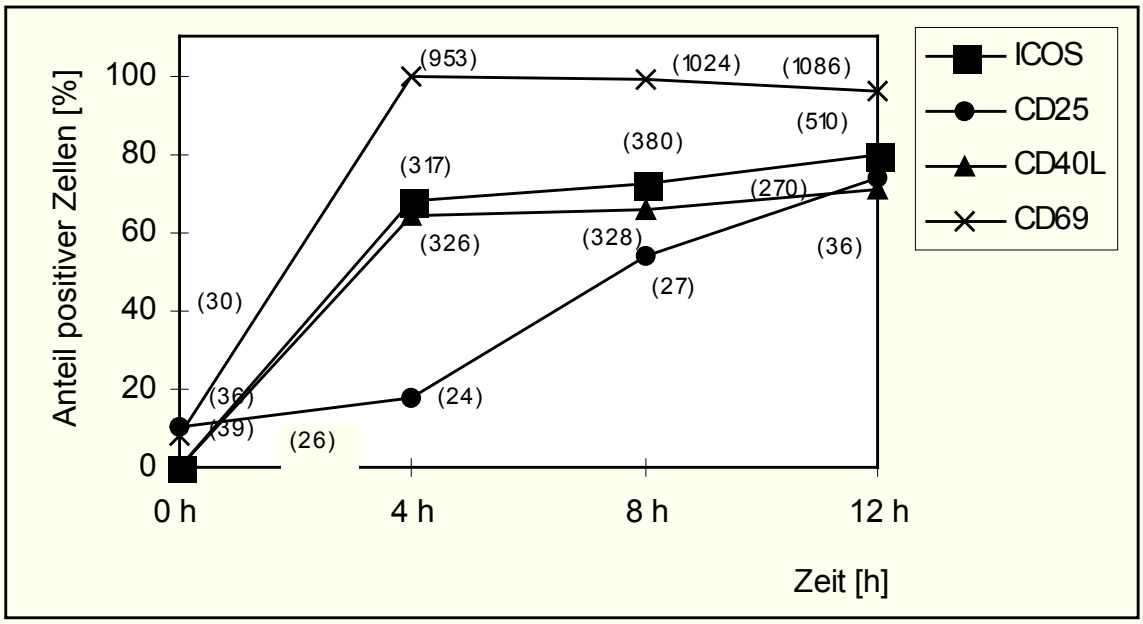

Abb. 2a: **Stimulation mit PMA und Ionomycin**

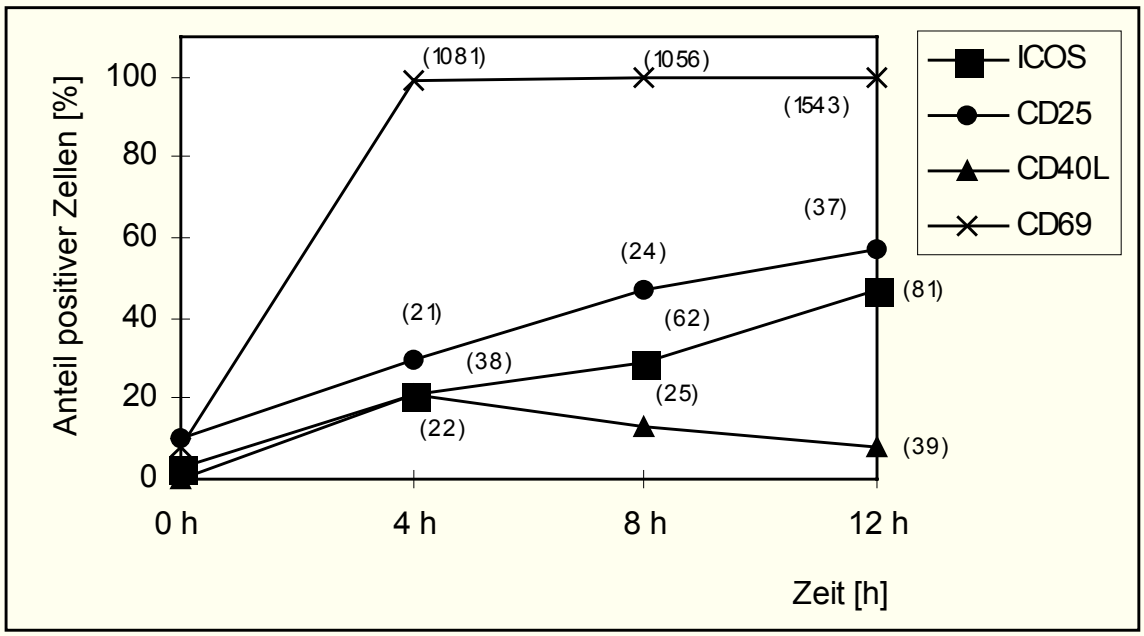

Abb. 2b: **Stimulation mit PMA**

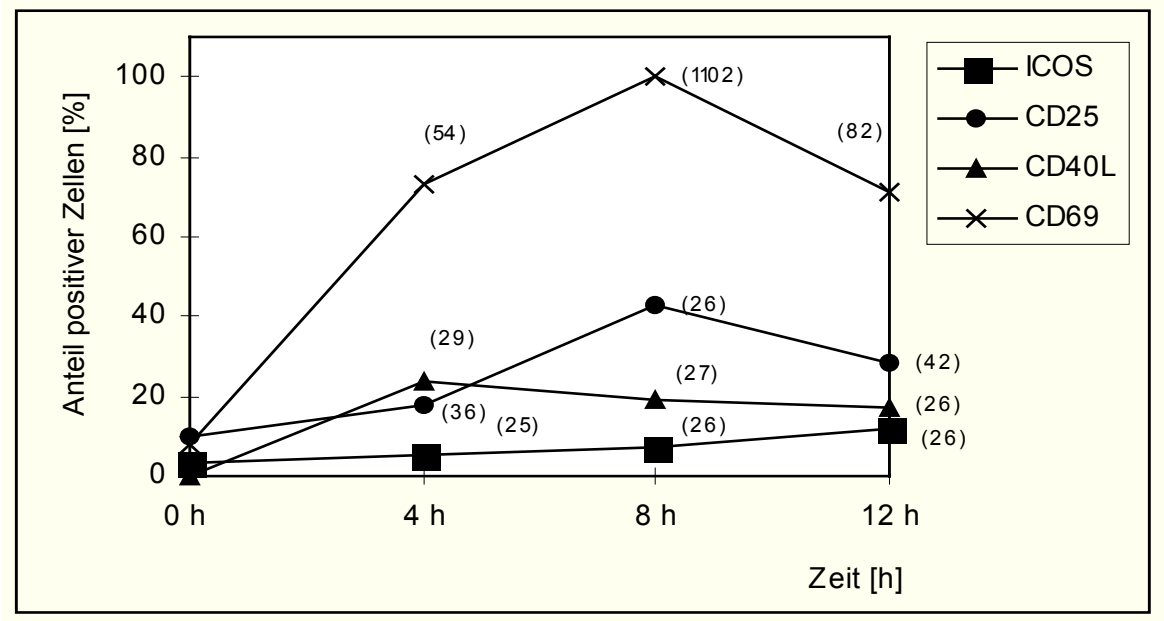

Abb. 2c **Stimulation mit Ionomycin**

Abb. 2a, b und c: **Vergleich der ICOS Expression mit anderen T-Zellaktivierungsantigenen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.** Die Zellen wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) stimuliert, zu den angegebenen Zeiten wurde die Oberflächenexpression von ICOS, CD25, CD40L und CD69 in der Durchflußzytometrie untersucht. Zusätzlich zu den prozentualen Anteilen positiver Zellen an der Gesamtpopulation ist jeweils der mean, d.h. die durchschnittliche Expressionsdichte der Oberflächenantigene angegeben (Zahlen in Klammern).

Allerdings dauert die Expression des ICOS Moleküls deutlich länger an als die von CD40L, dessen Expression nach 12 Stunden bereits wieder herunterreguliert wird. CD25 wird deutlich später als ICOS hochreguliert. Die Herunterregulation des ICOS Moleküls konnte unter diesen Bedingungen nicht gezeigt werden, da selbst nach 96 Stunden noch 90% der Zellen ICOS positiv waren und die Kulturen dann aufgrund des starken Mediumverbrauchs abgebrochen werden mußten. Die Zweisignalabhängigkeit eines Moleküls äußert sich außerdem in der Blockierbarkeit seiner durch PMA und Ionomycin induzierten Expression durch CsA. Auch dieser Umstand konnte für ICOS bestätigt werden. In Abb.3 ist die Expression des ICOS Moleküls, induziert durch PMA/Ionomycin Stimulation, der Expression unter CsA Einfluß gegenübergestellt. Die ICOS Expression ist deutlich herabgesetzt und somit von der Funktion des Calcineurin Moleküls, das in den durch PMA/Ionomycin induzierten Signaltransduktionsweg eingeschaltet ist, abhängig.

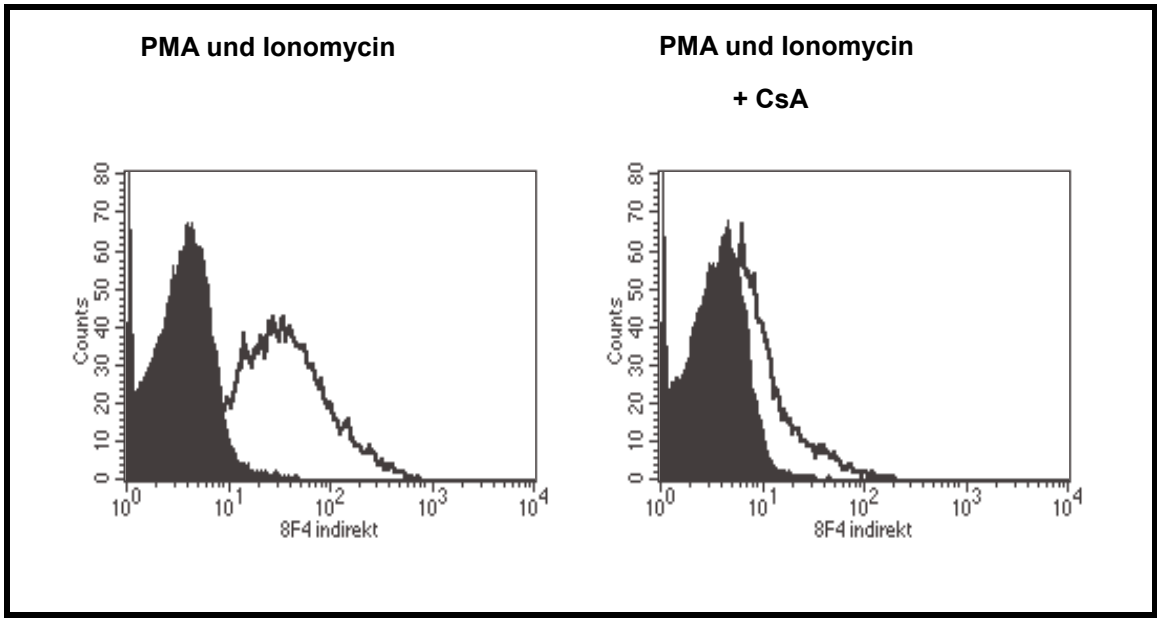

Abb. 3 **Cyclosporin A Sensitivität der ICOS Expression.** Die Bezeichnung "8F4" ist der ursprüngliche Name des ICOS Moleküls. Die Zellen wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) (links), bzw. PMA und Ionomycin und CsA (1 µg/ml) (rechts) stimuliert. Die ICOS Expression wurde nach 8 h in der Durchflußzytometrie untersucht. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität des ICOS Moleküls (offene Linie) im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (schwarz). Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität dargestellt, auf der Y-Achse die Zellzahl.

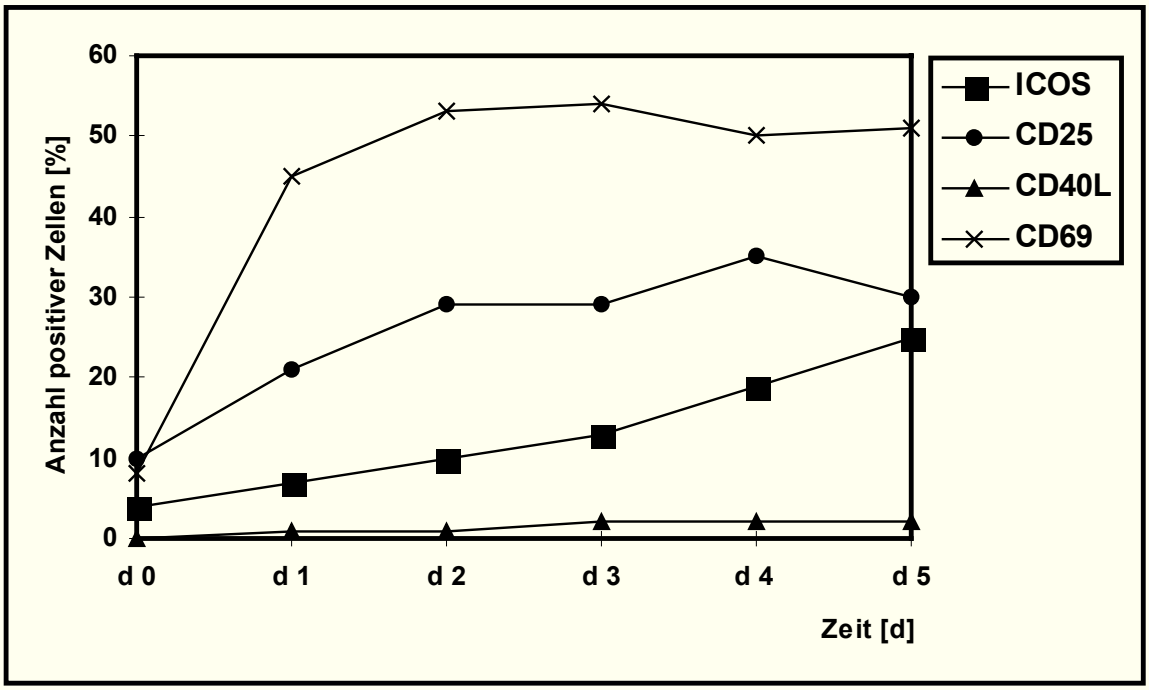

Abb. 4 **Expression des ICOS Moleküls im Vergleich mit anderen T-Zellaktivierungsantigenen nach Stimulation mit PHA P.** Das PHA P wurde den Zellen unmittelbar zu Beinn der Kultur zugesetzt. Die erforderliche Konzentration war in Vorexperimenten austitriert worden. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen angefärbt und die Expression der Oberflächenantigene mittels Durchflußzytometrie untersucht.

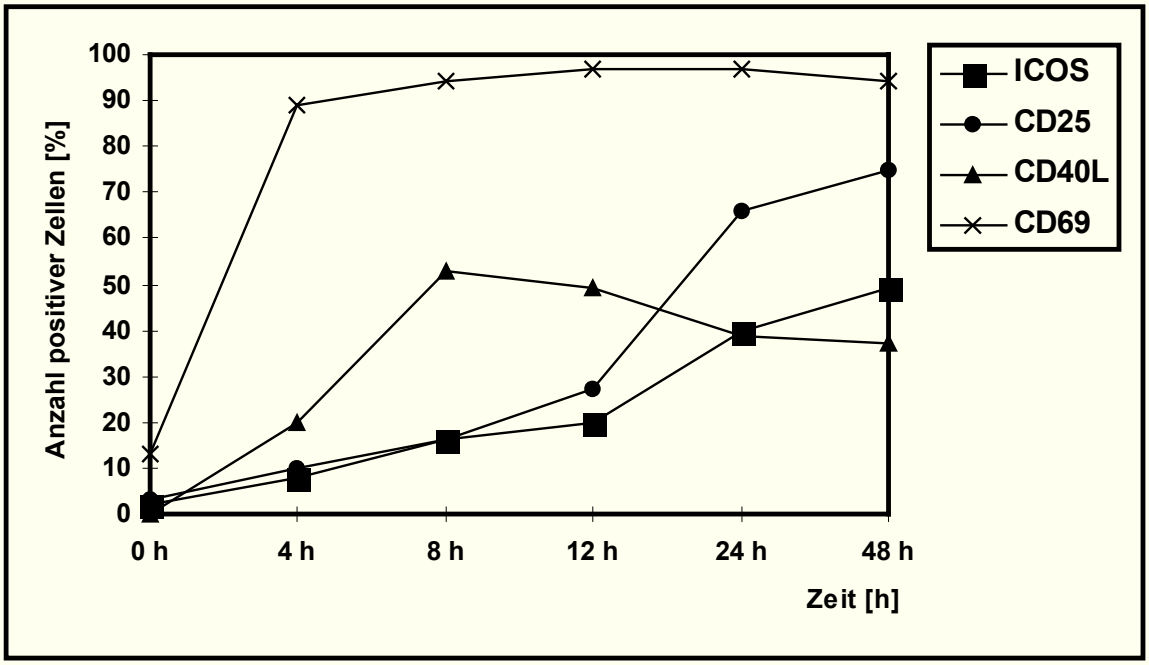

Abb. 5 **Expression des ICOS Moleküls im Vergleich mit anderen T-Zellaktivierungsantigenen nach Stimulation mit anti-CD3 Ak.** Die Stimulation erfolgte in 96-Loch Platten, die mit anti-Maus IgG und nachfolgend mit anti-CD3 Ak beschichtet worden waren. Die Konzentration der Antikörper wurden austitriert. In jedes Loch wurden 100 000 Zellen eingebracht. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen angefärbt und die Expression der Oberflächenantigene mittels Durchflußzytometrie untersucht.

Auch Stimulationen von NTZ über PHA P bzw. immobilisierte anti-CD3 Ak bestätigten die oben dargelegten Befunde, wenn auch bedingt durch den unterschiedlichen Angriffsort dieser stimulierenden Agenzien charakteristische Unterschiede auftraten. In Abb. 4 ist die Expressionskinetik von ICOS, induziert durch PHA P, der Expression von anderen T-Zellaktivierungsantigenen, induziert durch die gleiche Stimulation, gegenübergestellt. In Abb. 5 sind die Ergebnisse einer Stimulation über immobilisierte anti-CD3 Ak dargestellt.

Auch hier zeigt sich die starke Abhängigkeit der ICOS Expression von zwei Signalen. Sowohl PHA P wie auch der CD3 Ak greifen primär am TZR an, so daß diese Stimulation einer Situation ohne Kostimulation entspricht, wenn auch diese Stimulationsformen sich nicht so genau als „Ein-Signal Situation“ definieren lassen, wie die Stimulation mit PMA oder Ionomycin allein. Die deutlich verzögerte und auch bezüglich der erreichten Dichte verringerte ICOS Expression (Abb. 2c im Vergleich zu Abb. 4 und 5) zeigen jedenfalls, daß diese Stimulationsbedingungen nicht diejenigen intrazellulären Signaltransduktionswege induzieren die für die maximale Expression des Moleküls notwendig sind.

5.2 Kostimulatorische Effekte des ICOS Moleküls

Nachfolgend werden eine Reihe von Ergebnissen vorgestellt, die die kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls charakterisieren.

5.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der kostimulatorischen Wirkung auf die Proliferation

Vorbefunde hatten gezeigt, daß die Kreuzvernetzung des ICOS Moleküls eine kostimulatorische

Wirkung auf T-Zellen ausübt. Dieser Effekt sollte in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Eine Zielsetzung war den wirksamen Konzentrationsbereich des mAk F44 festzustellen. Um dies genauer zu untersuchen, wurden $CD4^+$-T Zellen mit einer definierten, in Vorexperimenten austitrierten Menge eines immobilisierten anti-CD3 Ak stimuliert, der in dieser Konzentration alleine keine Proliferation induzieren konnte. Zusätzlich wurden die Zellen durch unterschiedliche Konzentrationen des immobilisierten mAk F44 stimuliert. Am dritten Tag der Kultur wurde die Proliferation der Zellen durch ^{3}[H] Thymidin Einbau (wie in 4.4 beschrieben) gemessen.

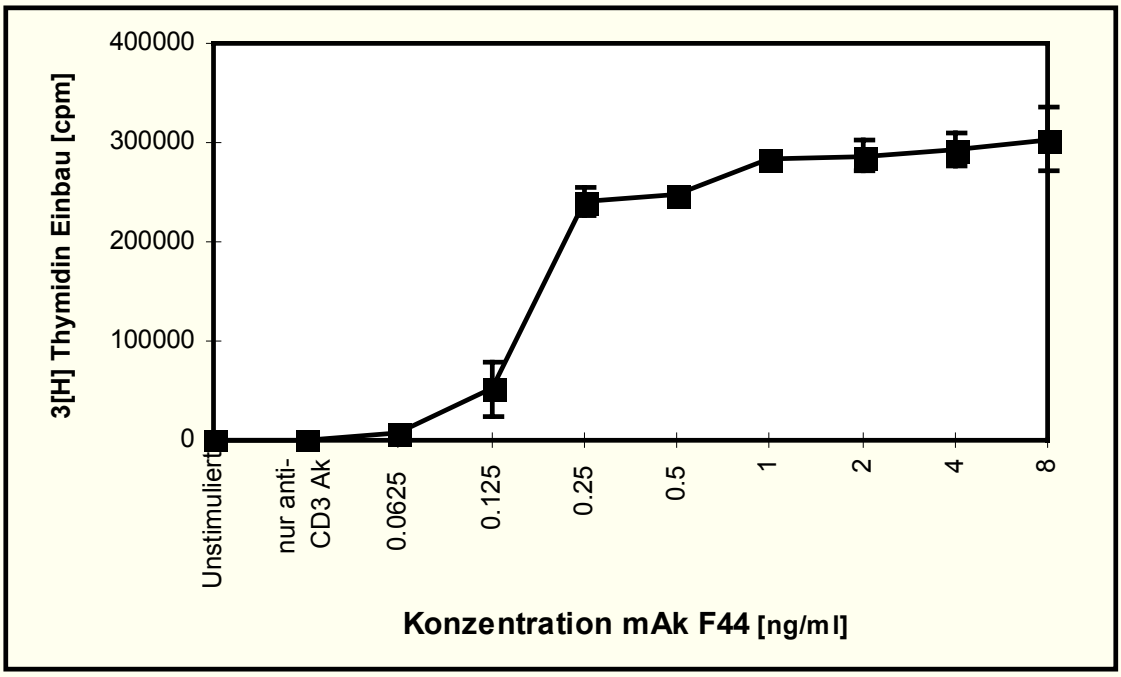

Abb. 6 **Konzentrationsabhängigkeit der kostimulatorischen Wirkung des ICOS Moleküls.** $CD4^+$-Zellen wurden durch immobilisierte anti-CD3 Ak und den mAk F44 in 96-Loch Platten stimuliert. In jedem Loch befanden sich 100 000 Zellen. An d 2 wurde den Zellen 1 µCi ^{3}[H]-Thymidin zugesetzt. Nach einer 16 h Inkubation wurde die Proliferation der Zellen im Szintillationszähler gemessen. Die Werte stellen Vierfachwerte eines repräsentativen Experiments dar (n=3).

Wie in Abb. 6 zu sehen ist, ermöglichte die verwendete Konzentration des anti-CD3 Ak alleine keine Proliferation der T-Zellen. Die deutlich konzentrationsabhängige Wirkung der zusätzlichen Kostimulation über den mAk F44 ist der Abb. 6 ebenfalls zu entnehmen. Bei den fünf durchgeführten Experimenten war die notwendige Mindestkonzentration des mAk F44, die zu einem Proliferationsanstieg führte, unterschiedlich (zwischen 0,0625 µg/ml und 1 µg/ml). Auch die Konzentration, ab der ein Maximum an Proliferation zu verzeichnen war, schwankte. Die Konzentrationsabhängigkeit, die sich im Kurvenverlauf widerspiegelt, war jedoch in allen Experimenten gleich, so daß diese Schwankungen wohl am ehesten darauf zurückzuführen waren, daß die Stimulierbarkeit der Zellen eine gewisse Spenderabhängigkeit zeigt.

Durch die hier gezeigte Wirkung auf die Proliferation ergeben sich verschiedene Fragen: zunächst die Frage, welche anderen Parameter u.U. durch diese kostimulatorische Wirkung des mAk F44 reguliert werden können, was in den in 5.2.2 dargestellten Experimenten untersucht wird. Zweitens stellt sich die Frage, welche Faktoren an der Heraufregulation der Proliferation beteiligt sind. Dieser Frage wird insbesondere in 5.2.2.2.1 und in 5.2.2.2 im Allgemeinen nachgegangen.

5.2.2 Wirkung der Kostimulation durch das ICOS Molekül auf andere T-Zellaktivierungsparameter

Um die Auswirkungen einer kostimulatorischen Aktion des ICOS Moleküls näher zu untersuchen, wurden verschiedene Parameter im Hinblick darauf untersucht, ob sich ihre Ausprägung durch Kostimulation via ICOS verändert. Die ausgewählten Parameter spielen eine bedeutende Rolle bei der Funktion einer T-Effektorzelle und ermöglichen somit vorsichtige Rückschlüsse auf die Rolle des ICOS Moleküls bei einer Immunantwort in vivo. Als Primärstimulus, der die Parameter alleine nicht oder nur suboptimal induzieren kann, der für die Induktion der Parameter durch Kostimulation aber notwendig ist, wurden in den folgenden Experimenten immobilisierte anti-CD3 Ak benutzt (s. 4.3.1.3). Als kostimulatorisches Signal diente die Kreuzvernetzung des ICOS Moleküls und in einigen Experimenten auch des CD28 Moleküls über spezifische mAk. Zum Vergleich wurde eine Situation ohne Kostimulus hergestellt, in der neben dem anti-CD3 Ak ein unspezifischer mAk immobilisiert wurde, um auszuschließen, daß die gemessenen Effekte auf der unspezifischen Adhäsion an einen Antikörper zustande kommen.

5.2.2.1 Wirkung auf die Expression anderer Oberflächenaktivierungsantigene am Beispiel von CD25 und CD40L

Die Neuexpression zahlreicher Oberflächenantigene, sogenannter Aktivierungsantigene, ist, abgesehen von intrazellulären Veränderungen, die früheste meßbare Veränderung im Rahmen einer T-Zellaktivierung und somit einer T-Zellabhängigen Immunantwort. Die zeitlich streng kontrollierte Expression ganz bestimmter Moleküle (z.B. auch des ICOS Moleküls selbst) ermöglicht es der T-Zelle, ihre Aufgaben im Rahmen der Immunantwort wahrzunehmen. Um zu untersuchen, inwiefern eine Kostimulation über das ICOS Molekül zur Induktion/Heraufregulation der für die T-Zellfunktion wichtigen Aktivierungsantigene führt, wurde dies exemplarisch an den zwei T-Zellaktivierungsmolekülen CD25 und CD154 (CD40L, TRAP) analysiert. Beide Moleküle spielen eine wichtige Rolle in der T-Zellimmunantwort. CD25, als hochaffiner Rezeptor für den T-Zellwachstumsfaktor IL-2, versetzt die T-Zellen in die Lage auf diesen Wachstumsfaktor zu reagieren, wodurch sich die Zahl der T-Zellen, die sich an einer Immunantwort beteiligen können, drastisch erhöht *[Schwartz, R.H., 1990]*. Das Molekül CD40L ist essentiell an der Interaktion von T- und B-Zellen beteiligt, die letztlich zu einer humoralen Immunantwort führt. Ohne die Interaktion zwischen CD40L und CD40, sezernieren die B-Zellen deutlich weniger IgG und IgM *[Banchereau, J. et al., 1994]*.

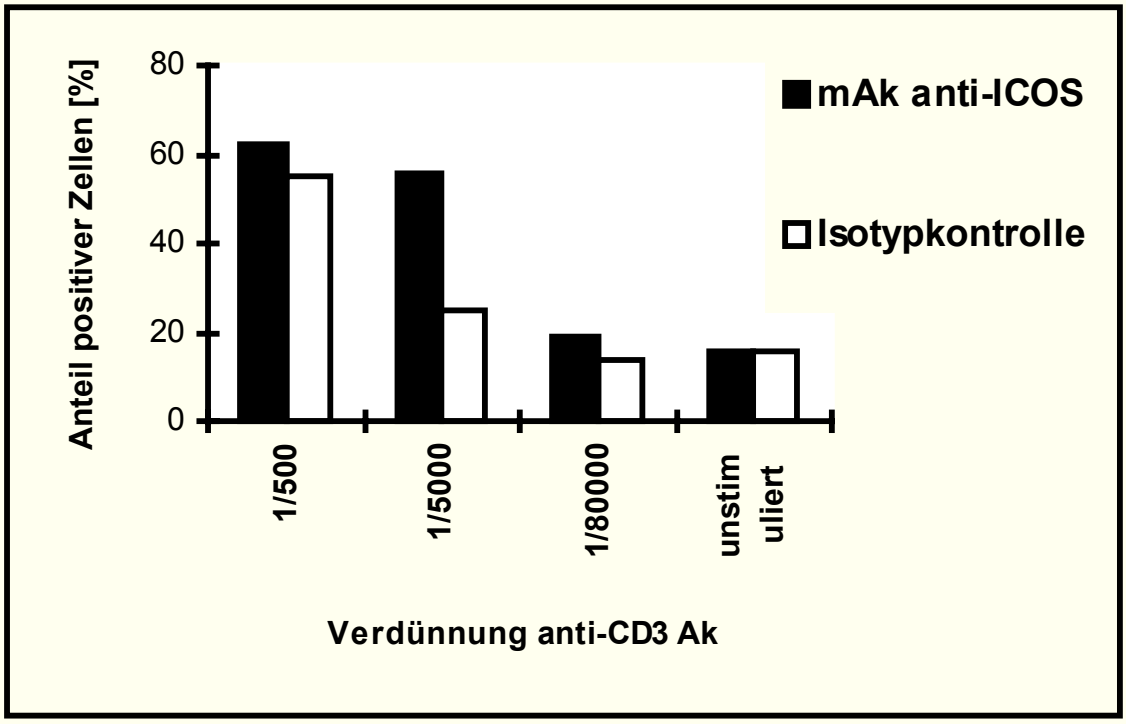

Abb. 7 **Kostimulatorischer Effekt des ICOS Moleküls auf die Expression von CD25.**

100 000 $CD4^+$-Zellen wurden in Löchern einer 96-Loch Platte mit immobilisiertem anti-CD3 Ak und mAk F44 oder einer Isotypkontrolle stimuliert. Nach 24 h wurde die CD25 Expression der Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht (n=4).

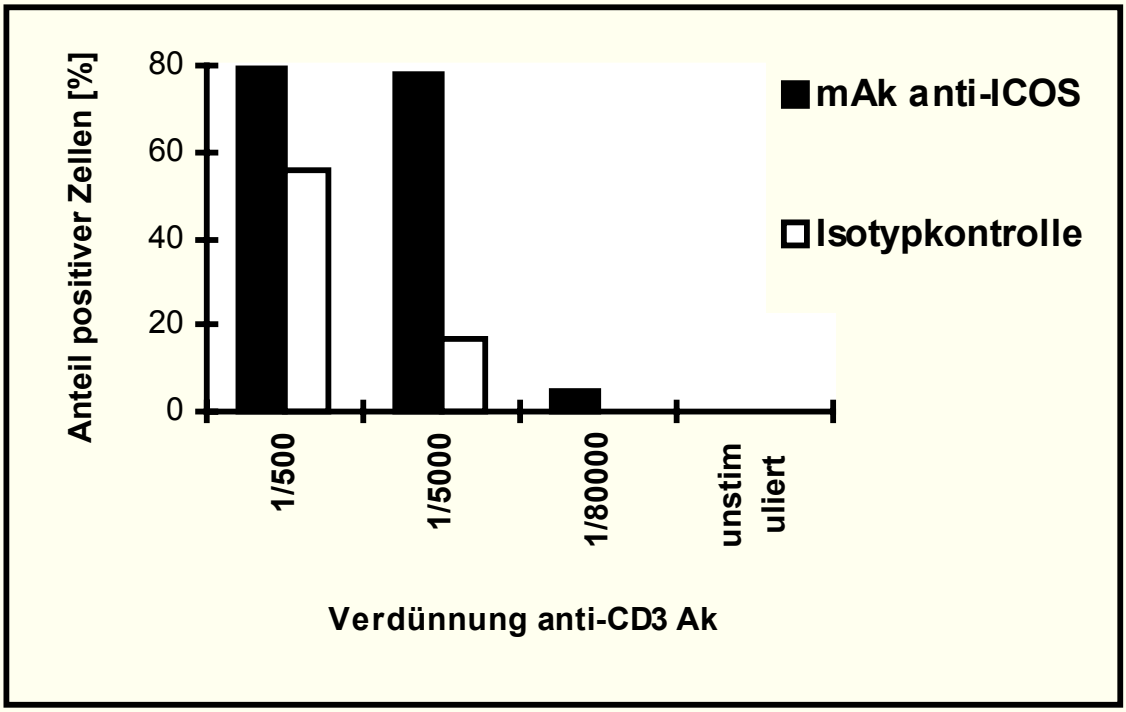

Abb. 8 **Kostimulatorischer Effekt des ICOS Moleküls auf die Expression von CD40L.**

100 000 $CD4^+$-Zellen wurden in Löchern einer 96-Loch Platte mit immobilisiertem anti-CD3 Ak und mAk F44 oder einer Isotypkontrolle stimuliert. Nach 24 h wurde die CD40L Expression der Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht (n=4).

Für die Analyse wurden $CD4^+$-Zellen durch anti-CD3 Ak und den mAk F44 oder eine Isotypkontrolle stimuliert und mittels Durchflußzytometrie nach 12 Stunden ihre CD40L und CD25 Expression untersucht. Wie in Abb. 7 und 8 zu sehen ist, reguliert das ICOS Molekül die Expression beider Moleküle herauf. In dem Bereich der anti-CD3 Ak Verdünnung, in dem die Stimulation über das CD3 Molekül alleine nur noch einen geringen Anteil der Zellen stimuliert, CD40L oder CD25 zu exprimieren, wird durch die Kostimulation über das ICOS Molekül die Expression beider Moleküle signifikant heraufreguliert. Dies trifft nicht nur für den Anteil positiver Zellen zu, sondern auch für die Dichte der Expression, was nicht dargestellt ist. Die beiden Säulen in Abb. 7 und 8 für die 1/5000 Verdünnung zeigen diesen Effekt deutlich. Der Effekt durch Kreuzvernetzung des ICOS Moleküls beträgt für CD25 ca. Faktor 2, Faktor 5 für CD40L.

Wurden die Zellen durch hohe Konzentrationen von anti-CD3 Antikörpern stimuliert, so war alleine durch die Stimulation über das CD3 Molekül die Expression von CD25 oder CD40L hoch, zusätzliche Ligation des ICOS Moleküls verstärkte diese Expression aber noch (Abb.8 und 9, anti-CD3 Verdünnung 1/500). Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, daß die durch anti-CD3 Ligation erzielte Expression bereits die maximal mögliche Expression induzierte. Dafür spricht auch, daß die erzielbare Höchstexpression der Oberflächenmoleküle beinahe identisch ist, wenn die Zellen mit anti-CD3 Ak, Verdünnung 1/5000, und mAk F44 stimuliert wurden oder eine maximale anti-CD3 Ak Konzentration (1/500) verwendet wurde. Die Verstärkung der Expression der beiden Moleküle auf eine signifikante Expressionsstärke scheint v.a. im Hinblick auf die in vivo Situation wichtig zu sein, in der die Stärke des 1. Signal durch geringe Mengen an Antigen limitiert ist, so daß die hierdurch erzielbare Expression von Aktivierungsantigenen nicht ausreichen würde, um eine effektive T Zellantwort zu ermöglichen. Erst durch die Kostimulation über das ICOS Molekül, als zweites oder kostimulatorisches Signal würde dann eine T-Zelleffektorantwort möglich. Die Experimente zeigen aber auch, daß die Stimulation der T Zellen über das 1. Signal zumindest einer bestimmten Stärke bedarf, damit die Zellen überhaupt auf eine zusätzliche Stimulation durch Kreuzvernetzung von ICOS reagieren können. Sehr niedrige anti-CD3 Ak Konzentrationen (ab einer 1/40 000 Verdünnung) ermöglichen keine Induktion/Heraufregulation der Oberflächenaktivierungsantigene CD25 oder CD40L mehr. Dies ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß es zur Induktion des ICOS Moleküls selber einer bestimmten Stimulation bedarf. Die maximale ICOS Expression beträgt zu diesem Zeitpunkt (12 h Stimulation) etwa 20% (induziert durch eine 1/1000 Verdünnung des Anti-CD3 Ak) und ist deutlich abhängig von der Konzentration an eingesetztem anti-CD3 Ak (nicht gezeigt). Nur wenn das ICOS Molekül selbst in einer ausreichenden Dichte exprimiert wird, kann die Kreuzvernetzung über den F44 Antikörper zu den– bis jetzt noch nicht analysierten– intrazellulären Signalen führen, die eine Expression von anderen Aktivierungsantigenen verstärken.

5.2.2.2 Wirkung der Kostimulation durch das ICOS Molekül auf die Zytokinsekretion

Um genauer zu untersuchen, welche Ursachen und Wirkungsmechanismen der kostimulatorischen Funktion von ICOS – die sich auf die Proliferation, die Heraufregulation von CD25 und CD40L und die Immunglobulinsynthese auswirkt – zugrunde liegen, wurden Kostimulationsexperimente mit $CD4^+$-T Zellen durchgeführt; nach Stimulation über 24 bzw. 48 Stunden, wurden die erzeugten Überstände abgenommen und mit IL-2, -4, -5 und IFN-γ spezifischen ELISAs analysiert.

Die Kostimulation über das CD28 Molekül wurde als Vergleich zur ICOS Kostimulation mitgeführt, da CD28 das am genauesten untersuchte kostimulatorische Molekül darstellt.

Stellvertretend für jeweils drei durchgeführte Experimente stehen Abb. 9 bis 13. Dabei ist v.a. zu konstatieren, daß sich die Kostimulation über das ICOS Molekül sehr unterschiedlich auf die Sekretion der analysierten Zytokine auswirkt.

5.2.2.2.1 Auswirkungen auf die IL-2 Sekretion

Die kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls auf die Sekretion von IL-2 war marginal und ließ sich auch durch eine längere Inkubation (48 Stunden) nicht steigern (Abb. 9). In allen drei Experimenten lagen die Werte direkt oberhalb oder unterhalb der Nachweisgrenze (durch Stimulation mit anti-CD3 Ak ohne Kostimulation ließ sich nie eine IL-2 Sekretion nachweisen). Dies überraschte, da hier also deutliche Unterschiede zur Kostimulation via CD28 auftraten. CD28 induzierte – in Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen, z.B. *Thompson, C.B. et al., 1989* – eine starke IL-2 Sekretion. Dieser Unterschied ließ sich nicht durch die mangelhafte Expression des ICOS Moleküls erklären, da die in diesen Experimenten verwendete anti-CD3 Ak Konzentration in einem Bereich lag, in dem die Höhe und Dichte der ICOS Expression ein Maximum erreichte (In Vorexperimenten austitriert, nicht gezeigt). Auch wurden als Kontrolle parallel Proliferationsassays durchgeführt (nicht gezeigt), um auszuschließen, daß sich die Zellpopulationen nicht stimulieren ließen.

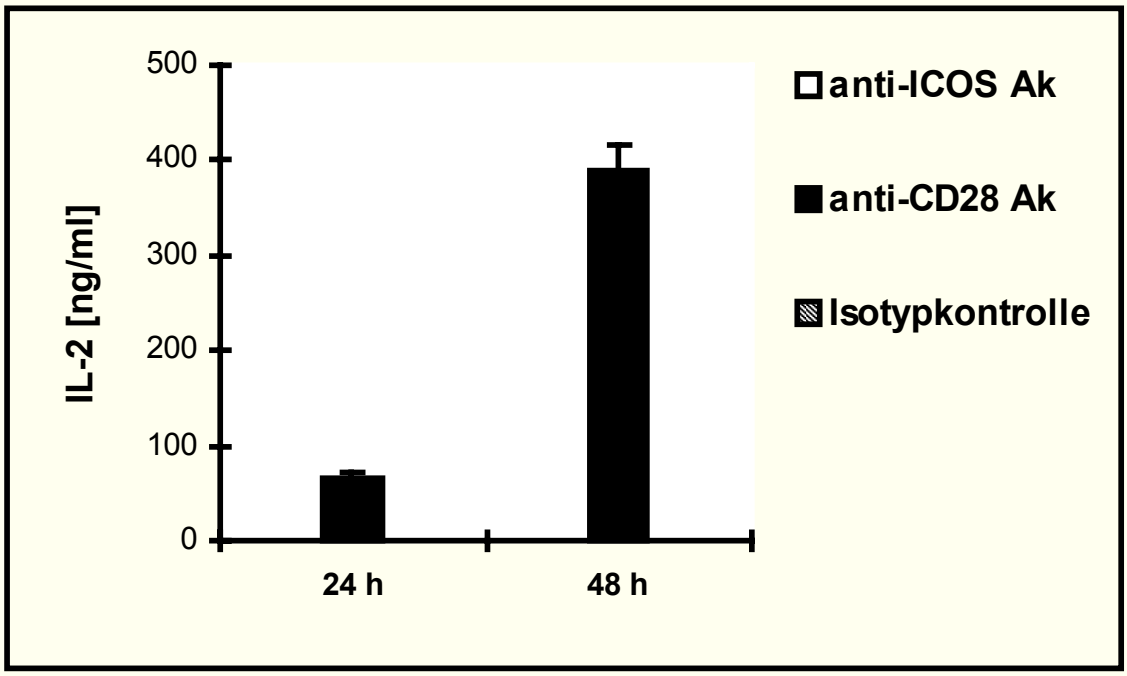

Abb. 9 **Auswirkungen der Kostimulation via ICOS und CD28 auf die IL-2 Sekretion.**

100 000 $CD4^+$-Zellen wurden in 96-Loch Platten mit immobilisiertem anti-CD3 Ak und mAk F44 oder mAk 9.3 oder einer Isotypkontrolle stimuliert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeiten abgenommen und mit einem IL-2 spezifischen ELISA analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachwerten dar, die aus einem repräsentativen Experiment stammen (n=3). Die Stimulation mit anti-CD3 Ak und Isotyp oder mAk F44 induzierte keine IL-2 Sekretion.

Die Proliferation zeigte sich im Bereich der geringen anti-CD3 Ak Konzentration deutlich abhängig von

der Kostimulation via ICOS oder CD28,eine kostimulatorische Wirkung auf die Zellen war also vorhanden. Somit bleibt festzustellen, daß bezüglich der Induktion der IL-2 Sekretion ein deutlicher Unterschied zwischen ICOS und CD28 besteht.

5.2.2.2.2 Auswirkungen auf die IL-4 Sekretion

Die Sekretion von IL-4 dagegen ist durch ICOS deutlich induzierbar; die Stimulation nur mit anti-CD3 Antikörper induziert keine IL-4 Sekretion (Abb. 10). Die kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls läßt sich durch eine längere Inkubationszeit auf etwa das Vierfache steigern (68 pg/ml nach 24 h, 252 pg/ml nach 48 h). Dies ist insofern erwähnenswert, als die Expression des ICOS Moleküls durch Stimulation mit anti-CD3 Ak nach 24 Stunden noch nicht ihren Maximalwert erreicht hat (s. 5.1, Abb. 5). Möglicherweise ist diese Vervierfachung also nicht nur auf die Akkumulation des Zytokins im Überstand durch die zusätzlichen 24 h Kultur zurückzuführen. Vielmehr könnte der Grund für die Vervierfachung darin liegen, daß eine gesteigerte Expression von ICOS während der zusätzlichen 24 h Kultur zu einer verstärkten Kreuzvernetzung von ICOS führen kann. Die verstärkte Kreuzvernetzung des ICOS Moleküls könnte sich dann direkt auf die Induktion von IL-4 auswirkt.

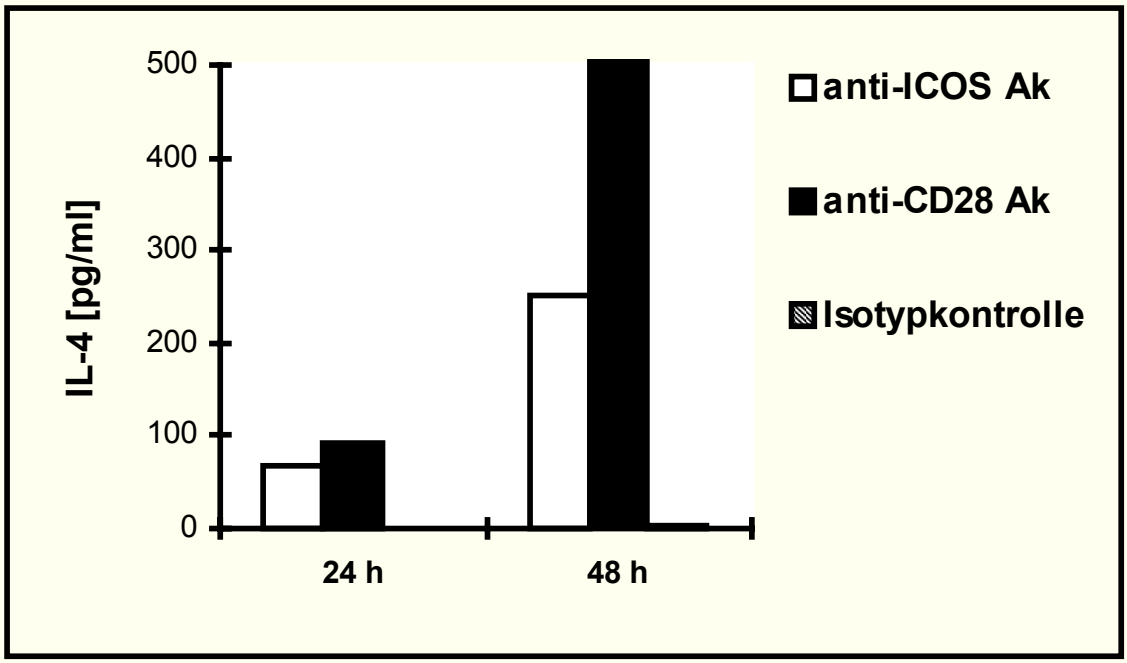

Abb. 10 **Auswirkungen der Kostimulation via ICOS und CD28 auf die IL-4 Sekretion.**

100 000 $CD4^+$-Zellen wurden in 96-Loch Platten mit immobilisierten anti-CD3 Ak und mAk F44 oder mAk 9.3 oder einer Isotypkontrolle stimuliert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeiten abgenommen und mit einem IL-4 spezifischen ELISA analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelwerten dar, die aus einem repräsentativen Experiment stammen (n=3). Die Stimulation mit anti-CD3 Ak und Isotyp induzierte keine IL-4 Sekretion.

Auch durch Kostimulation via CD28 läßt sich die Sekretion von IL-4 induzieren. Die gemessenen Werte sind nach 48 h etwa zwei bis zweieinhalbfach so hoch, wie die Werte, die durch eine Kostimulation via ICOS entstehen. Die Stärke der kostimulatorischen Wirkung von CD28 ist also unter den dargestellten Bedingungen beträchtlich größer. Auch sie ist kulturdauerabhängig, wobei hier die Ursache wohl eher in der Akkumulation des Zytokins zu sehen ist, da die Expression des CD28

Moleküls durch anti-CD3 Stimulation nicht neu induziert wird.

5.2.2.2.3 Auswirkungen auf die IL-5 Sekretion

Die Sekretion von IL-5 nach 24 Stunden ließ sich weder durch Stimulation via anti-CD3 Ak noch durch zusätzliche Kostimulation via mAk F44 induzieren (Abb. 11). Lediglich durch Kostimulation via CD28 ließ sich eine meßbare Menge IL-5 nachweisen. Dieses Bild änderte sich jedoch durch eine längere Kulturperiode. Nach 48 Stunden ließ sich durch Stimulation mit anti-CD3 Ak eine Sekretion von 142 pg/ml induzieren. Durch zusätzlich Kostimulation via ICOS wird diese Menge ungefähr um das Fünffache gesteigert (672 pg/ml), die Kostimulation via CD28 führt zu einer Steigerung um das etwa Zehnfache (1510 pg/ml).

Möglicherweise wird für die Induktion der IL-5 Sekretion eine höhere ICOS Expression benötigt, als für die Induktion der IL-4 Sekretion. Auffällig ist außerdem, daß die längere Inkubation in den mit CD28 kostimulierten Kulturen zu einer Steigerung der IL-5 Menge um den Faktor 10 führt, so daß konstatiert werden kann, daß die Sekretion von IL-5, stärker als die von IL-4, abhängig von der in der Kultur erfolgten Kumulation zu sein scheint.

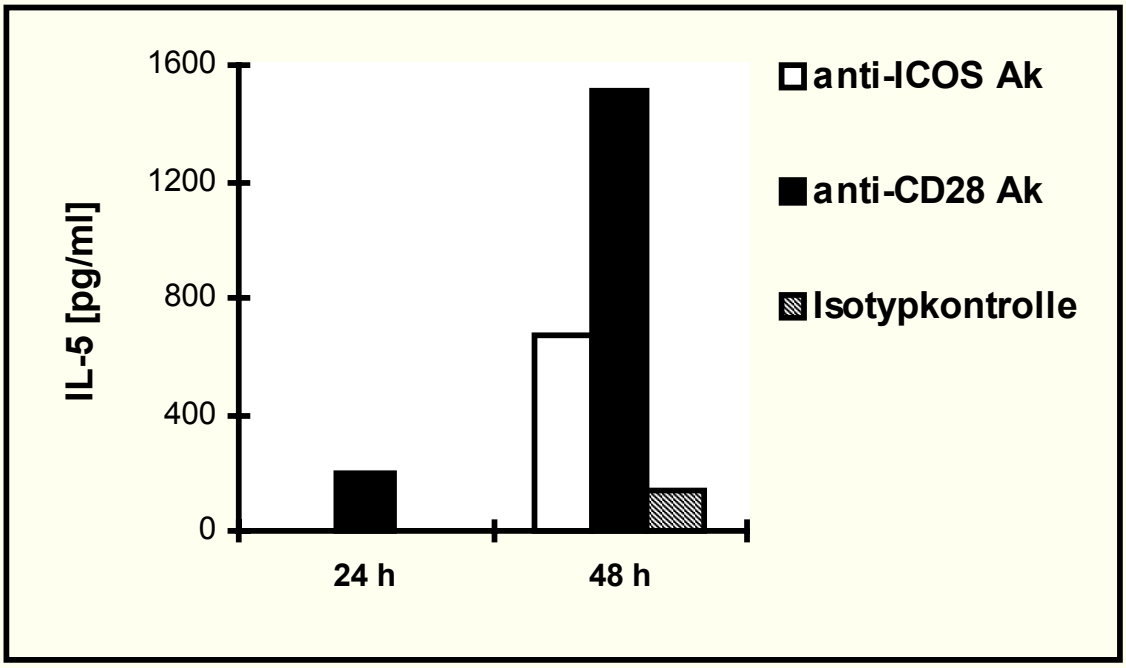

Abb. 11 **Auswirkungen der Kostimulation via ICOS und CD28 auf die IL-5 Sekretion.**

100 000 $CD4^+$-Zellen wurden in 96-Loch Platten mit immobilisierten anti-CD3 Ak und mAk F44 oder mAk 9.3 oder einer Isotypkontrolle stimuliert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeiten abgenommen und mit einem IL-5 spezifischen ELISA analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelwerten dar, die aus einem repräsentativen Experiment stammen (n=3). Die Stimulation via anti-CD3 Ak und Isotypkontrolle oder mAk F44 induzierte nach 24h keine IL-5 Sekretion.

5.2.2.2.4 Auswirkungen auf die IFN-γ Sekretion

Bezüglich der IFN-γ Sekretion ist zu bemerken, daß IFN-γ bereits durch Stimulation über den anti-CD3 Ak induziert werden konnte und unter diesen Bedingungen die Menge des sezernierten IFN-γ durch längere Inkubation gesteigert wurde (Abb. 12). Eine zusätzliche Kostimulation über den mAk F44

steigert die derart erzielten Konzentrationen jedoch noch einmal deutlich. Betrug die Sekretion von IFN-γ im dargestellten Experiment durch Stimulation mit anti-CD3 Ak (und Isotypkontrolle) 288 pg/ml nach 24 h und 1283 pg/ml nach 48 h, so ließ sie sich durch Kostimulation via ICOS auf das Drei bis Vierfache steigern (24 h: 923 pg/ml, 48 h: 5052 pg/ml). Die kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls ist also erneut abhängig von der Inkubationsdauer. Das gleiche gilt für die Kostimulation via anti-CD3 Ak und Isotypkontrolle, wie auch via anti-CD3 und anti-CD28 Ak, wenn auch die erzielte Steigerung hier nicht so stark ist (Steigerung ungefähr um das Zweieinhalbfache für die Kostimulation via CD28). Möglicherweise ist die Erhöhung, die durch Kumulation erreichbar ist, in diesem Fall wiederum geringer als die gesteigerte Sekretion, die durch verstärkte Expression und Kreuzvernetzung des ICOS Moleküls entsteht. Bezüglich des ICOS/CD28 Vergleichs zeigt sich für IFN-γ, daß die Kostimulation via CD28 nach 24 Stunden zu etwa dreifach höheren Mengen von sezerniertem Zytokin führt, als durch Kostimulation mit ICOS (2477 pg/ml IFN-γ Sekretion via anti-CD28 Ak zu 923 pg/ml IFN-γ Sekretion via anti-ICOS Ak). Werden die Zellen jedoch länger stimuliert, ist dieser Faktor nur noch marginal (6151 pg/ml IFN-γ via CD28 Ak im Vergleich zu 5052 pg/ml via anti-ICOS Ak). Dies spricht dafür, daß die kostimulatorische Wirkung von ICOS auf die IFN-γ Sekretion genauso stark ist wie die Wirkung von CD28; die nach 24 Stunden noch deutlich geringere Sekretion kann auf die zu diesem Zeitpunkt noch schwache Expression von ICOS zurückgeführt werden.

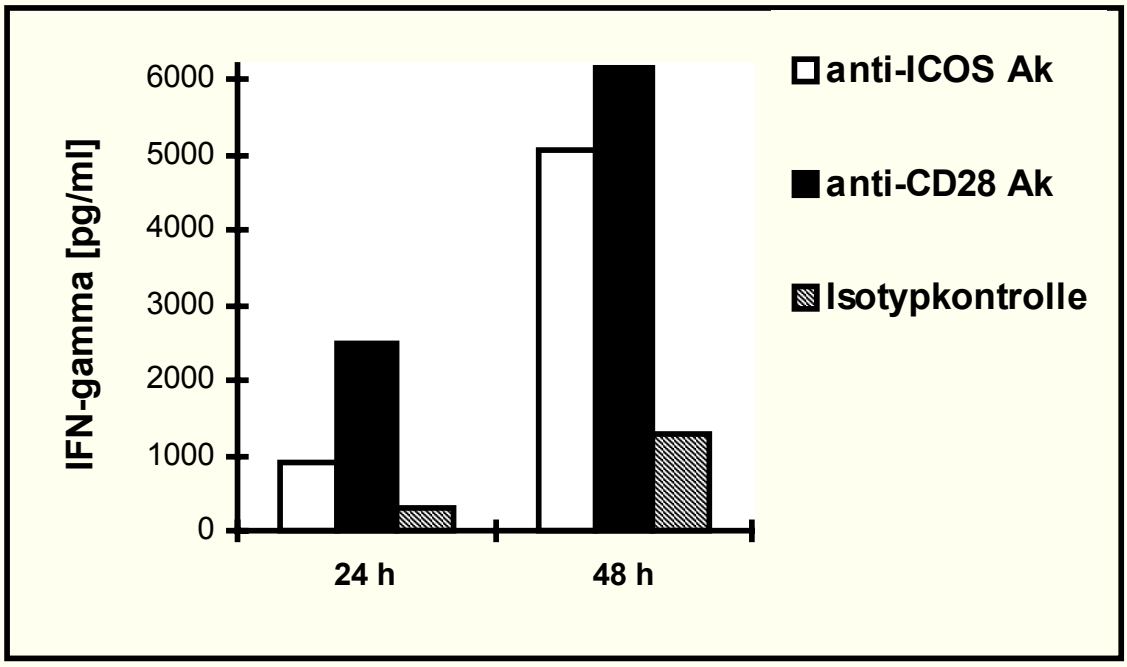

Abb. 12 **Auswirkungen der Kostimulation via ICOS und CD28 auf die IFN-γ Sekretion.**

100 000 $CD4^+$-Zellen wurden in 96-Loch Platten mit immobilisierten anti-CD3 Ak und mAk F44 oder mAk 9.3 oder einer Isotypkontrolle stimuliert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeiten abgenommen und mit einem IFN-γ spezifischen ELISA analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelwerten dar, die aus einem repräsentativen Experiment stammen (n=3).

5.2.2.2.5 Auswirkungen auf die ATAC Sekretion

Das ATAC Molekül stellt ein Molekül aus der Familie der Chemokine dar, das hauptsächlich von $CD8^+$-Zellen sezerniert wird. *[Müller, S. et al., 1995]* Das ICOS Molekül wird auch auf $CD8^+$-Zellen durch Aktivierung induziert, wenn auch mit langsamerer Kinetik als bei $CD4^+$-Zellen (nicht gezeigt). Es bestand also die interessante Möglichkeit mit ähnlich angelegten Versuchen, wie den bereits dargestellten, zu untersuchen, ob die Kostimulation über das ICOS Molekül auch bei $CD8^+$-Zellen die Zytokinsekretion verstärkt und somit zu ähnlichen Ergebnissen führt, wie bei den $CD4^+$-Zellen. Im Unterschied zu den Versuchen, die in 5.2.2.1 bis 5.2.2.4 beschrieben wurden, wurde hier über einen aufgereinigten anti-CD3 Ak (OKT3) stimuliert, dessen Konzentration die maximal auf den Zellkulturplatten immobilisierbare Menge betrug. Die Abnahme der Überstände erfolgte zu drei Zeitpunkten (27, 51 und 75 h), da unklar war, inwiefern sich die langsamere Kinetik der Induktion des ICOS Moleküls auf $CD8^+$-Zellen auf dessen kostimulatorische Wirkung auswirken würde. Auch hier wurde ein Vergleich zu CD28 gezogen.

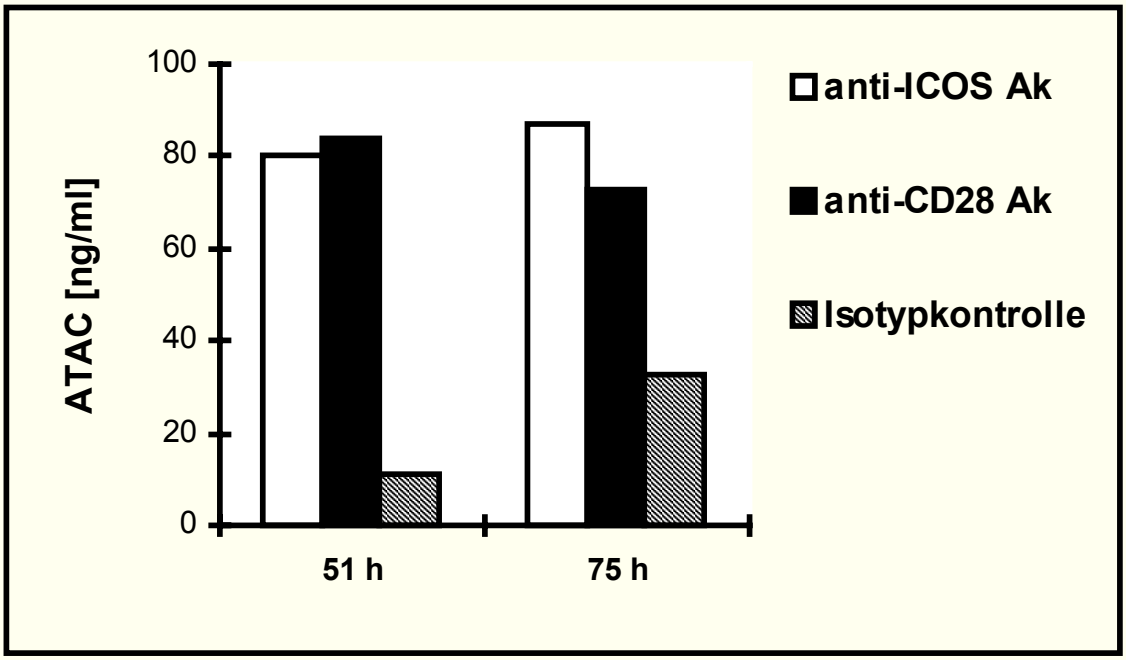

Abb. 13 **Auswirkungen der Kostimulation via ICOS und CD28 auf die ATAC Sekretion.**

100 000 $CD8^+$-Zellen wurden in 96-Loch Platten mit immobilisierten anti-CD3 Ak und mAk F44 oder mAk 9.3 oder einer Isotypkontrolle stimuliert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeiten abgenommen und mit einem ATAC spezifischen ELISA analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelwerten dar, die aus einem repräsentativen Experiment stammen (n=2).

In Abb. 13 ist das Ergebnis eines Experiments zu sehen (es wurden zwei Experimente durchgeführt). Dargestellt sind die Ergebnisse des 51 und des 75 h Wertes. Die nach 27 h sezernierte Menge war unter allen Stimulationsbedingungen zu gering, um sie zu analysieren. Auffällig ist, daß die Wirkung des ICOS Moleküls hier durchaus auch quantitativ mit der Wirkung des CD28 Moleküls zu vergleichen ist. Der Faktor der Verstärkung der ATAC Sekretion, der durch die Kostimulation erzielt wurde, beträgt 3 bzw. 2 für die Kostimulation via ICOS bzw. CD28 zum 75 h Zeitpunkt. Zum 51 h Zeitpunkt ist die durch die Kostimulation erzielte Verstärkung der Sekretion höher (Faktor 7 b.z.w. 8 für

Kostimulation via ICOS b.z.w. CD28) allerdings ist das Maximum der Kostimulation durch ICOS zu diesem früheren Zeitpunkt noch nicht erreicht (51 h: 80 ng/ml, 75 h: 87 ng/ml) und es ist nicht ausgeschlossen, daß eine noch längere Stimulation, den durch ICOS Kostimulation erzielbaren Absolutwert noch steigen läßt. Dies ist v.a. deshalb erwähnenswert, weil zu diesem Zeitpunkt die maximale ICOS Expression der $CD8^+$-Zellen bei weitem noch nicht erreicht ist.

Insgesamt ist also die kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls auf die Sekretion der verschiedenen Zytokine sehr heterogen. Sie reicht von der Unfähigkeit, eine signifikante Menge zu induzieren (IL-2) über die deutlich verzögerte Wirkung im Vergleich zur Kostimulation via CD28 (IL-5) bis hin zu Werten, die kaum (IFN-γ) bzw. sogar geringfügig höher (ATAC) sind als die Werte, die durch CD28 Kostimulation erzielt werden. Als weiterer wichtiger Befund ist herauszustellen, daß das durch das ICOS Molekül induzierte Zytokinmuster nicht dem durch CD28 gleicht, hier also deutliche Unterschiede bezüglich der kostimulatorischen Effekte der beiden Moleküle bestehen.

5.2.2.3 Wirkung der Kostimulation durch das ICOS Molekül auf die durch T-Zellen induzierte Immunglobulin Sekretion von B-Zellen

Immunhistochemische Untersuchungen von primär (Thymus) und sekundär lymphatischem Gewebe haben gezeigt, daß die Expression des ICOS Moleküls relativ streng auf die Helle Zone des Keimzentrums des Lymphfollikels im sekundär lymphatischen Gewebe beschränkt ist. Die B-Zellen in diesem Bereich sind durch vorherige klonale Expansion in der dunklen Zone des Keimzentrums stark expandiert worden. Außerdem hat eine somatische Hypermutation der hypervariablen Bereiche der Immunglobuline stattgefunden. In der hellen Zone finden dann folgende Prozesse statt: a) Selektion der B Zellen, deren Ak die höchste Affinität für das, die Immunantwort auslösende, Antigen zeigen und b) möglicherweise der Immunglobulinklassenwechsel. Auch wird angenommen, daß in der hellen Zone ein Signal gegeben wird, daß die Differenzierungsrichtung der B-Zelle in Richtung Plasmazelle oder B-Gedächtniszelle reguliert *[Liu, Y.-J. and Arpin, C., 1997 MacLennan, I.C.M. et al., 1994]*.

Es wurde ein Kokultursystem etabliert, um zu untersuchen inwiefern sich die Kostimulation via ICOS, auf die Fähigkeit der T-Zellen B-Zellhilfe zu leisten, auswirkt. In diesem System werden T-Zellen über immobilisierte anti-CD3 Ak stimuliert, wobei sich durch zusätzliche Immobilisierung von kostimulatorischen Antikörpern bzw. unspezifischen Isotypkontrollen, die Funktion dieser kostimulatorischen Ak untersuchen läßt. Diese stimulierten T-Zellen sind in der Lage, B-Zellen zur Immunglobulinsekretion anzuregen *[Lipsky, P.E., 1990]*, deren Menge durch ELISAs bestimmt werden kann. Die Wirkung von CD28 als kostimulatorisches Molekül ist in diesem System umfangreich untersucht worden *[De Boer, M. et al., 1993, Klaus, S.J. et al., 1994, Kwekkeboom, J. et al., 1994]*, weshalb es sich anbot, die kostimulatorische Wirkung von CD28 mit der von ICOS zu vergleichen.

In Abb. 14a und b wurden $CD4^+$-Zellen mit tonsillären B-Zellen koinkubiert und die Überstände nach 8 Tagen Kultur abgenommen, bei -80° C gefroren, gelagert und dann durch einen für IgG bzw. IgM spezifischen ELISA untersucht.

Es zeigt sich deutlich, daß für die Induktion der Sekretion von IgM, wie auch IgG unter den angegebenen anti-CD3 Ak Konzentrationen die zusätzliche Kreuzvernetzung eines kostimulatorischen

Moleküls, wie ICOS oder CD28, notwendig ist. Die Stimulation über den anti-CD3 Ak mit der Isotypkontrolle ermöglichte kaum eine Immunglobulinsekretion, die gemessenen Werte lagen regelmäßig unterhalb oder knapp oberhalb der Nachweisgrenze des ELISAs. Weiterhin wurde deutlich, daß auch hier eine ausreichende ICOS Expression (wie in 5.2.2.1) Voraussetzung für eine kostimulatorische Wirkung des ICOS Antigens ist.: Analog zu den Experimenten, die durch Abb. 7 und 8 dargestellt werden, nahm auch bei diesen Experimenten bei niedrigeren Verdünnungen des anti-CD3 Antikörpers die kostimulatorische Wirkung durch ICOS ab. Die kostimulatorische Wirkung des CD28 Moleküls, welches konstitutiv auch auf ruhenden T-Zellen exprimiert wird, wurde dagegen durch niedrigere anti-CD3 Ak Konzentrationen wenig bis gar nicht beeinflußt (exemplarisch in Abb. 14 dargestellt für die 1/10 000 Verdünnung des anti-CD3 Antikörpers im Vergleich zur 1/5000 Verdünnung). Im Unterschied zur Beeinflussung der Expression der Moleküle CD25 und CD40L wurde die Immunglobulinsekretion im Bereich höherer anti-CD3 Ak Konzentrationen durch kostimulatorische Wirkungen von ICOS oder CD28 nicht verstärkt (nicht gezeigt).

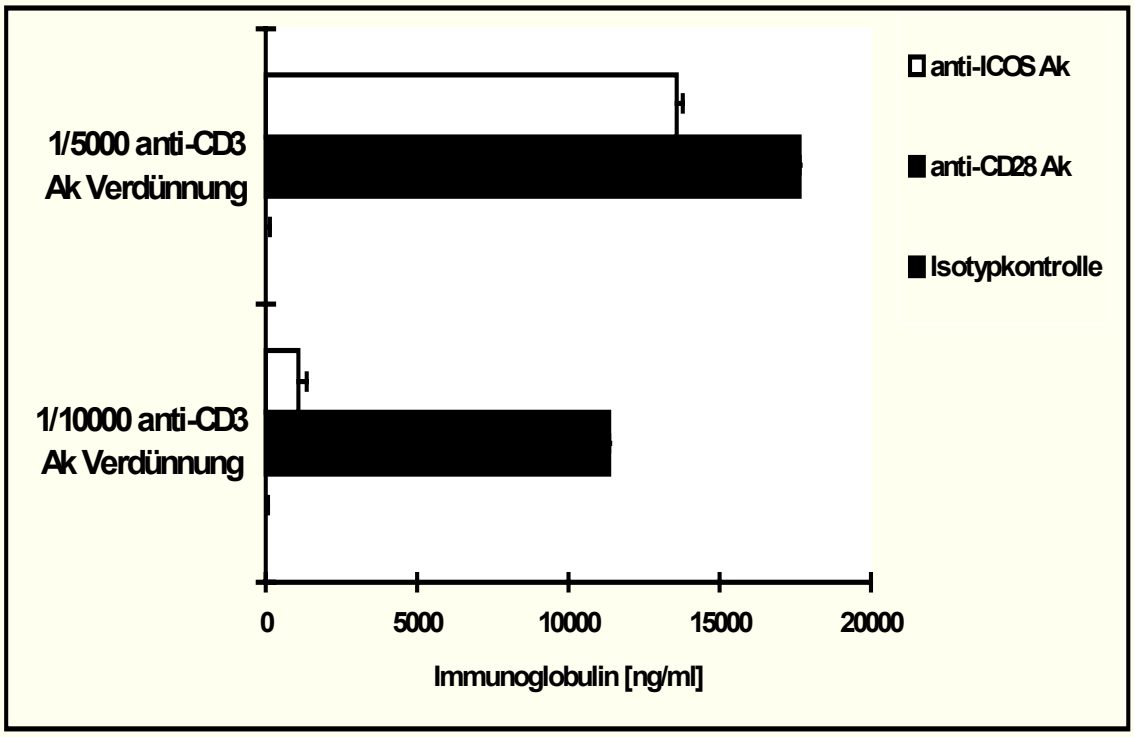

Abb. 14a **Auswirkungen auf die IgM Sekretion**

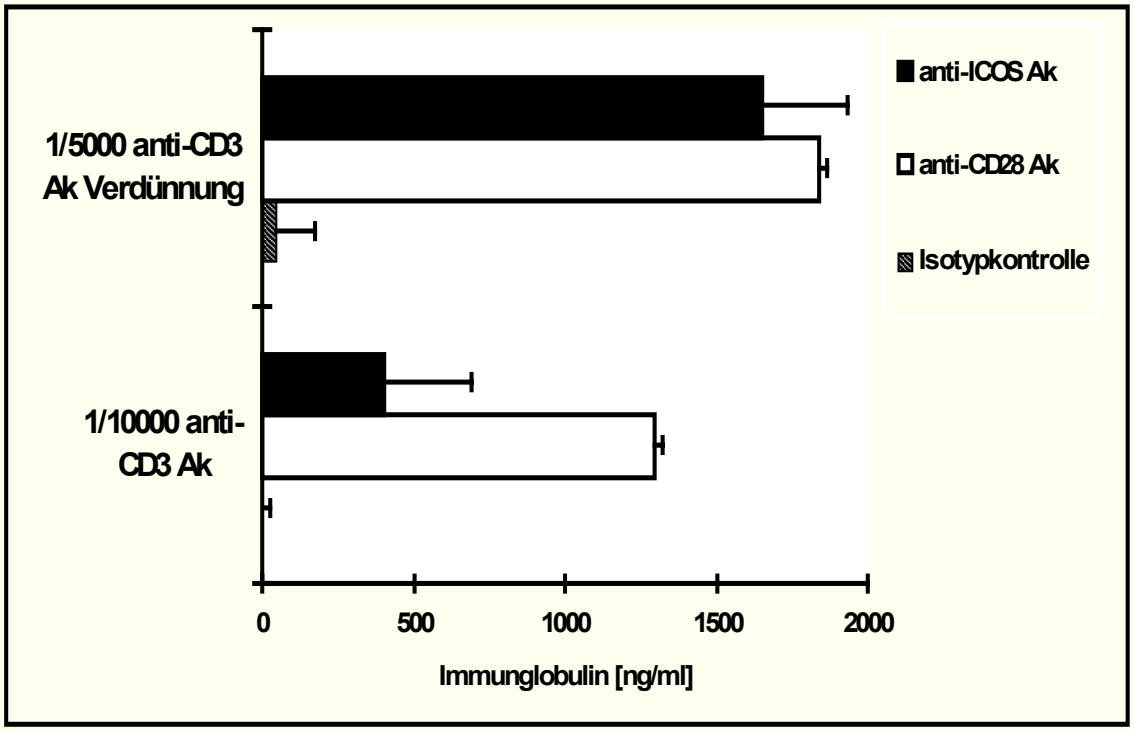

Abb. 14b **Auswirkungen auf die IgG Sekretion**

Abb. 14a und b **Kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls auf die Immunglobulinsekretion.** Jeweils 50 000 $CD4^+$-Zellen und 25 000 B-Zellen pro Loch wurden zusammen in 96-Loch Platten kultiviert. Die Platten waren zuvor mit anti-CD 3 Ak und mAk F44 oder mAk 9.3 oder einer Isotypkontrolle beschichtet worden. Die Überstände der Kulturen wurden nach 8 Tagen abgenommen und mittels eines IgM bzw. IgG spezifischen ELISAs analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Versuchsvierfachwerten eines repräsentativen Experiments dar (n=5). Die nur mit anti-CD3 Ak und Isotypkontrolle stimulierten Zellen regten keine Immunglobulinsekretion an.

Ähnlich wie für 5.2.2.1 ist zu konstatieren, daß die Signifikanz dieser Beobachtungen wohl v.a. in der möglichen Rolle in vivo zu sehen ist. In vivo, wo geringe Ag Konzentrationen vorliegen, könnte die T-Zellinduzierte Immunglobulinsekretion durch B-Zellen vollständig von der Wirkung kostimulatorischer Moleküle abhängig sein, so daß ohne ICOS (oder CD28) keine Immunglobulinsynthese stattfinden könnte.

5.2.2.4 Blockade der Interaktion des ICOS Moleküls mit seinem potentiellen Liganden

Die oben dargestellten Befunde zeigen deutlich, daß das ICOS Molekül mindestens eine indirekte Rolle bei der T-Zellvermittelten Immunglobulinsekretion durch B-Zellen spielt. Es erschien allerdings auch möglich, daß die direkte Interaktion von ICOS mit seinem potentiellen Liganden auf B-Zellen zur Immunglobulinsekretion durch B-Zellen beiträgt. Daher wurde untersucht, ob eine Blockade dieser Interaktion ebenfalls Effekte zeigt. Dabei wurde die Immunglobulinsynthese der tonsillären B-Zellen durch NTZ des peripheren Bluts initiiert, die ihrerseits durch PHA P aktiviert worden waren. Dieses Modell entspricht dem von *Lagresle, C. et al., 1995* verwendeten.

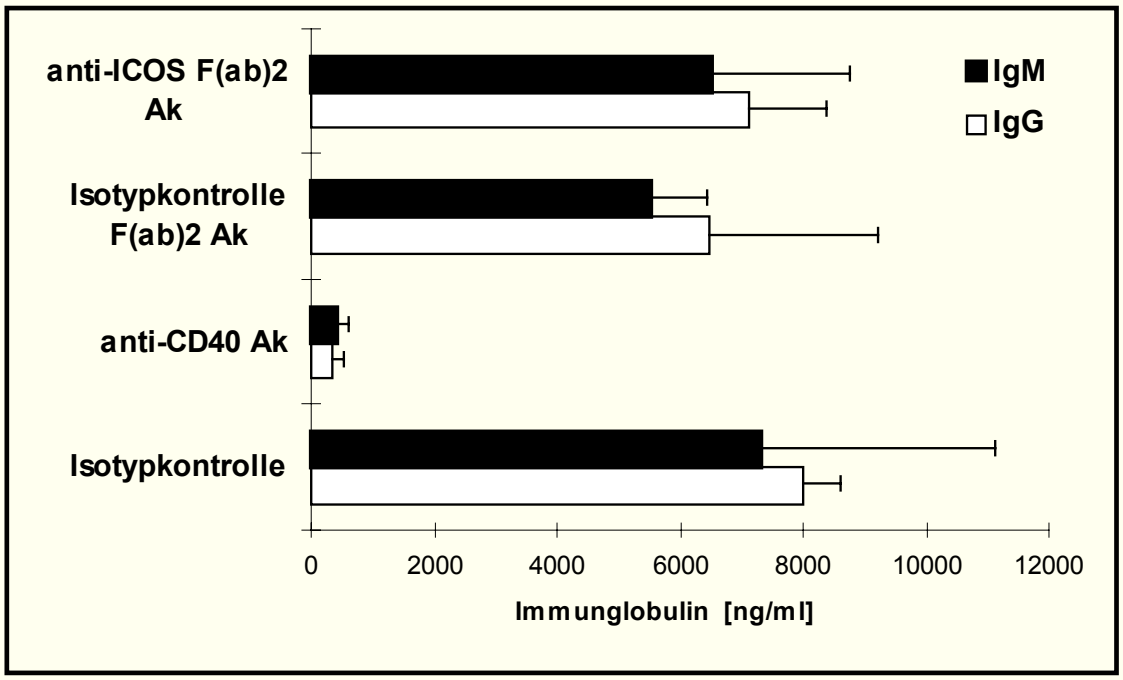

Abb. 15 **Blockade der Interaktion des ICOS Moleküls mit seinem potentiellen Liganden durch F(ab)2 Fragmente.** Die Kultur erfolgte in 96-Loch Platten, wobei sich in jedem Loch 50 000 $CD4^+$-Zellen und 50 000 B-Zellen befanden. Die Zellen wurden unmittelbar vor Beginn der Kultur zusammengefügt und das PHA P zugesetzt. (Konzentration in Vorexperimenten austitriert). Die Überstände dieser Kulturen wurden nach 12 Tagen mit einem IgG bzw. IgM spezifischen ELISA analysiert. Unstimulierte B-Zellen produzierten keine Immunglobuline. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Zur Blockade der ICOS Interaktion wurden $F(ab)_2$ Fragmente des mAk F44 verwendet, da es sich gezeigt hatte, daß die Immobilisierung der vollständigen F44 Ak über die Fc-Rezeptoren der B-Zellen zu einer Kostimulation der T-Zellen führt. Die Verwendung vollständiger Ak hätte dazu geführt, daß es unmöglich geworden wäre zwischen den über Kostimulation vermittelten Effekten und denen, die durch eine Interaktionsblockade vermittelt wurden, zu unterscheiden. Als positive Kontrolle für die Blockierbarkeit des Systems wurde ein CD40 Ak verwendet (als ganzer Ak, da durch ihn keine kostimulatorische Wirkung verzeichnet werden konnte). Für die Blockade der CD40/CD40L Interaktion ist sowohl in vitro wie auch in vivo gezeigt worden, daß sie zu einer reduzierten Immunglobulinsekretion und einem reduzierten Immunglobulinklassenwechsel führt *[Kwekkeboom, J. et al., 1994, Nishioka, Y. et al., 1994, Oxenius, A. et al., 1996]*. Diese Wirkung sollte mit einer potentiell ähnlichen Wirkung des ICOS Moleküls verglichen werden, weshalb die Überstände der Kulturen nach 12 Tagen abgenommen wurden und in IgM und IgG spezifischen ELISAs untersucht wurden.

In Abb. 15 ist deutlich zu sehen, daß die Blockade der CD40/CD40L Interaktion zu einer stark reduzierten IgG und IgM Sekretion führt. Für die Blockade der ICOS Interaktion traf dies allerdings nicht zu. In keinem der durchgeführten Experimente konnte eine Veränderung der sezernierten Immunglobulinmenge (weder IgG noch IgM) durch Blockade der Interaktion von ICOS und einem potentiellen Liganden auf B-Zellen nachgewiesen werden.

5.2.3 Kostimulation durch das ICOS Molekül bei Initialstimulation über lösliche Stimuli

Im folgend beschriebenen Experiment wurde der Wirkungsmechanismus der Kostimulation via ICOS näher untersucht. Die in 5.2.1 und 5.2.2.1 bis 5.2.2.3 dargestellten Ergebnisse beziehen sich alle auf eine Kostimulation via den mAk F44 mit einer Kreuzvernetzung des CD3 Moleküls als erstem Stimulus. Dabei bestehen grundsätzlich verschiedene Wirkungsmöglichkeiten eines derart definierten kostimulatorischen Moleküls *[Schwartz, R.H., 1990]*: Entweder werden die Zellen über das ICOS Molekül in einen verstärkten Kontakt mit dem anti-CD3 Ak gebracht, so daß dessen Wirkung verstärkt wird. Oder die kostimulatorische Wirkung von ICOS funktioniert unabhängig vom verwendeten 1.Stimulus, so daß angenommen werden kann, daß die Kreuzvernetzung des Moleküls einen spezifischen, intrinsischen Signaltransduktionsprozeß initiiert, bzw. in den intrazellulären Signaltransduktionsweg eingreift, der durch Ligation den 1. Stimulus induziert wurde.

Auch bezüglich dieser Fragestellung wurde ein Vergleich mit CD28 als kostimulatorischem Molekül durchgeführt, da dessen Wirkung in diesem System bereits beschrieben ist und somit einen guten Vergleich bezüglich der erzielbaren Ergebnisse darstellt *[Baroja, M.L. et al., 1989, Thompson, C.B. et al., 1989]*.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden NTZ mit löslichen Faktoren stimuliert, so daß der sogenannte „tethering“ (engl.=anbinden) Effekt, der auf der Verstärkung des 1. Signals über verstärkte Anhaftung an die auslösenden Antikörper beruht, ausgeschlossen werden konnte. Verwandt wurden die Reagentien PMA und PHA P. Zusätzlich erfolgte eine Immobilisierung der anti-ICOS Ak, anti-CD28 Ak und einer unspezifischen Isotypkontrolle.

Es zeigte sich, daß in keinem der drei Experimente eine kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls beobachtet werden konnte, wenn die Initialstimulation mit PMA erfolgte, während dies für CD28 deutlich zu zeigen war (Abb. 16a). Dagegen ist in Abb.16b dargestellt, daß das ICOS Molekül bei Initialstimulation mit PHA P eine deutliche kostimulatorische Wirkung auf die Proliferation ausübt. Die Steigerung der Proliferation um den Faktor zwei ist zwar sehr viel geringer als die Steigerung, die bei einer Initialstimulation mit anti-CD3 Antikörpern erzielt werden konnte (in diesen Versuchen wurde durch anti-CD3 Ak alleine keine Proliferation erzielt, die Proliferation also durch das ICOS Molekül initiiert, s. 5.2.1), war aber gleichmäßig in allen Experimenten zu verzeichnen und sollte somit spezifisch sein. Die vergleichsweise geringe Steigerung der Proliferation zeigte sich auch für die Kostimulation via CD28. Die geringere ICOS Expression, die sich durch PHA P erzielen läßt (s. 5.1., Abb. 4 und 5) scheint diesem Effekt also eher nicht zugrunde zu liegen, da die Kostimulation via CD28 von ähnlichen Effekten betroffen ist und die Expression von CD28 nicht aktivierungsabhängig ist.

Festzuhalten ist jedenfalls, daß die durch das ICOS Molekül initiierten Signaltransduktionsprozesse, die in den gemessenen kostimulatorischen Effekten resultieren, nicht nur bei einer Stimulation mit anti-CD3 Ak als erstem Signal auftreten. Die Wirkung des ICOS Moleküls stellt somit eine Form der Kostimulation dar, die unabhängig vom „tethering“ Effekt funktioniert.

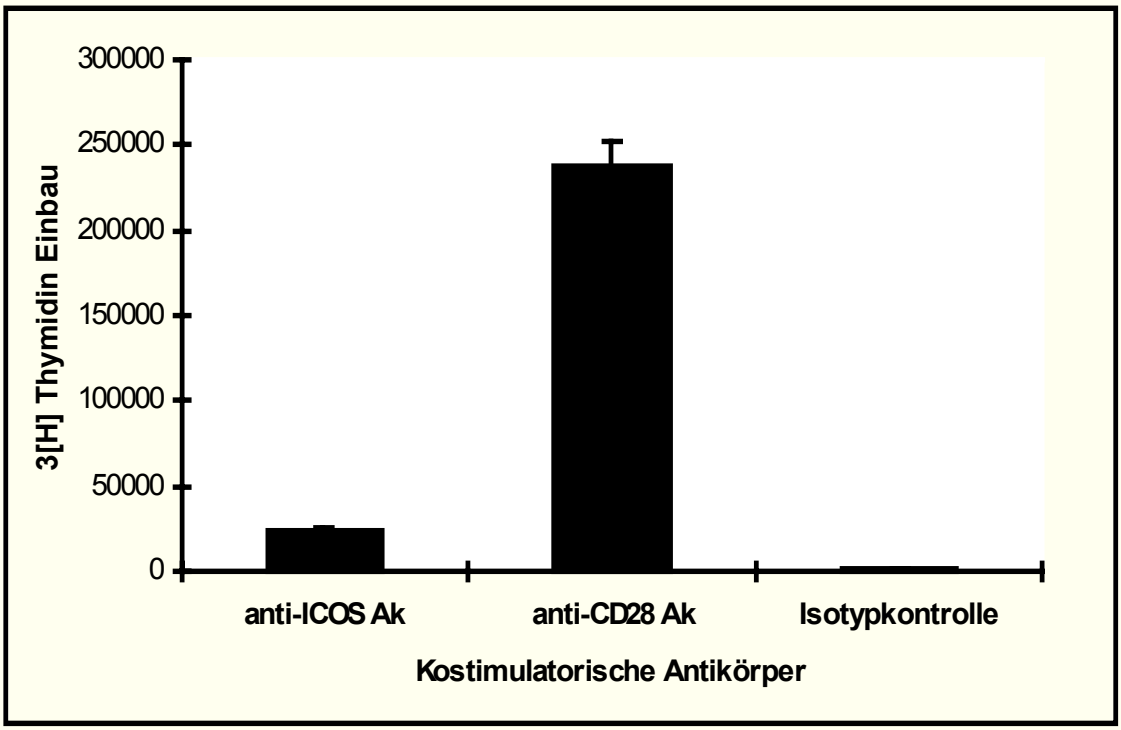

Abb. 16a **Kostimulation via ICOS mit PMA als erstem Signal.** NTZ wurden in 96-Loch Platten mit PMA stimuliert (100 000 Zellen/Loch). Die Konzentration des PMA betrug 0,625 ng/ml. Nach 4 Tagen wurde den Zellen 1 µCi ^{3}[H] Thymidin zugefügt und die Kultur weitere 16 h fortgeführt. Dann erfolgte die Analyse der Proliferation im Szintillationszähler. Dargestellt sind Mittelwerte von Versuchsvierfachwerten eines unabhängigen, repräsentativen Experiments (n=3).

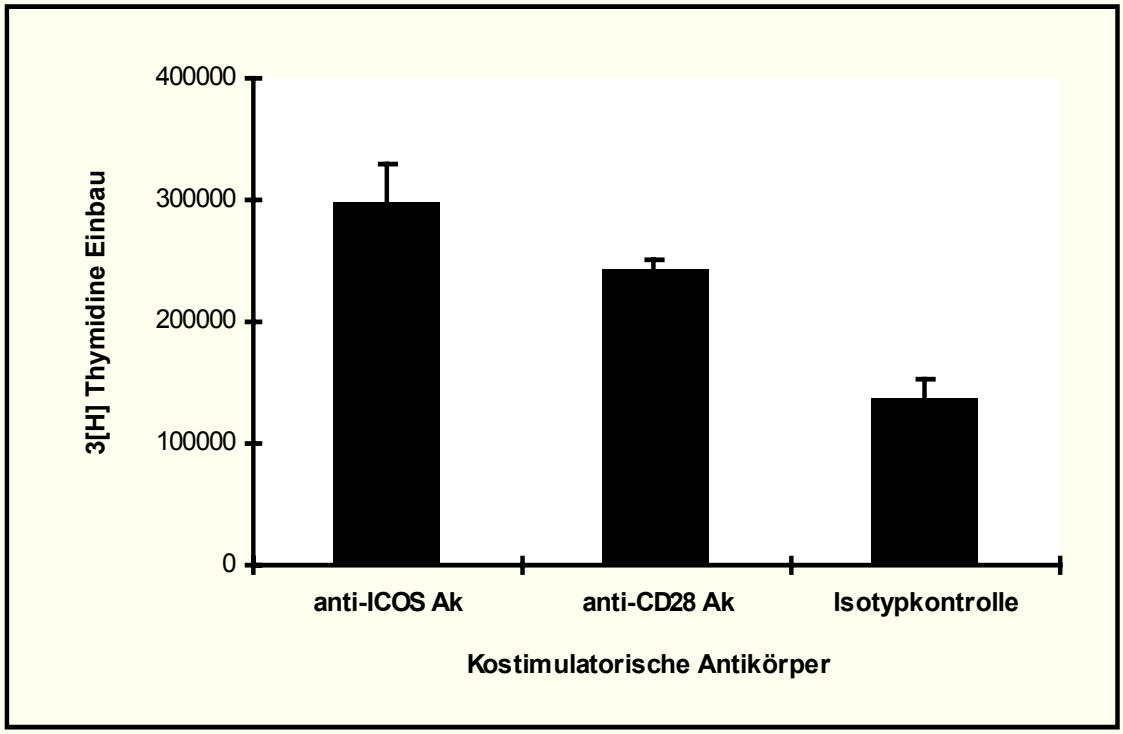

Abb. 16b **Kostimulation via ICOS mit PHA P als erstem Signal.** Zelldichte, Kulturbedingungen Analyse erfolgten analog zu Abb. 16b. Die Konzentration von PHA P war in Vorexperimenten austitriert worden. ^{3}[H] Thymidin wurde nach 4 d zugefügt. Dargestellt sind Mittelwerte von Versuchsvierfachwerten eines unabhängigen, repräsentativen Experiments (n=3).

5.3 Langzeitstimulation über das ICOS Molekül

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden die Effekte unterschiedlicher Kostimuli in einem System untersucht, in dem die Zellen zunächst über einen definierten Stimulus sieben Tage lang stimuliert wurden, was als erste Phase der Stimulation bezeichnet wird. Nach einer Ruheperiode von 24 h wurde die Zellpopulation dann drei Tage lang restimuliert, was im folgenden als zweite Phase der Stimulation bezeichnet wird. Die Immobilisierung der Ak erfolgte gemäß 4.3.1.3. Die Konzentration der löslichen Stimuli betrug: IL-2: 20 U/ml, PMA: 5 ng/ml.

5.3.1 Differentielle Stimulation in der zweiten Phase–Restimulation über das ICOS Molekül

Um zu untersuchen inwiefern die Kostimulation über das ICOS Molekül weiteren Befunden bezüglich der Kostimulation über CD28 gleicht, bzw. davon abweicht, wurde analysiert, welche Effekte die Kostimulation über das ICOS Molekül bei einer Restimulation bewirkt, die im Anschluß an eine Langzeitvorstimulation über das CD3 Molekül erfolgte. Ein wichtiger Befund bezüglich der Kostimulation über das CD28 Molekül ist, daß eine Kostimulation über CD28, die durch eine Vorstimulation ausgelöste Anergie und Apoptose verhindert *[Boussiotis, V.A. et al., 1995, Noel, P.J. et al., 1996a]*.

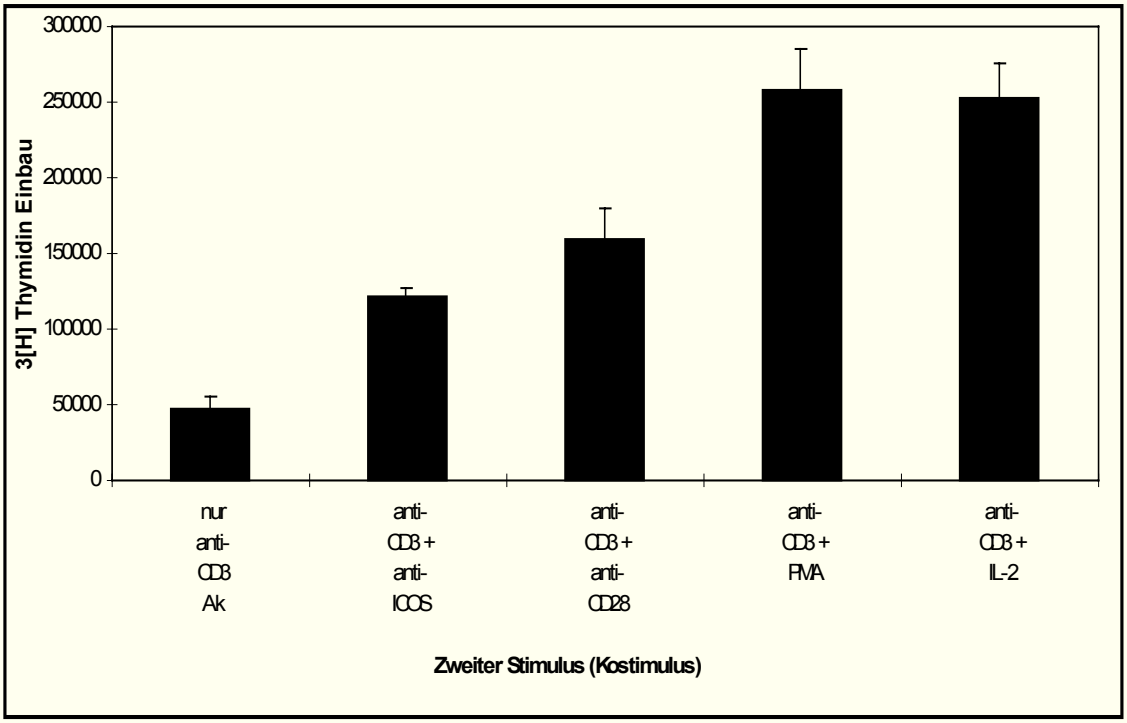

Abb. 17 **Restimulation von CD4$^+$-Zellen durch das ICOS Molekül und andere kostimulatorische Moleküle.** 200 000 CD4$^+$-Zellen wurden in 24-Loch Platten stimuliert, die mit anti-CD3 Ak beschichtet worden waren. An d 4, 5, und 6 wurde die Hälfte des Kulturmediums gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Nach d 7 wurden die Zellen für 24 h ohne Stimulus inkubiert, dann mit Trypanblau gezählt und jeweils 100 000 vitale Zellen in Löcher einer 96-Loch Platte gegeben. Dort erfolgte eine zweitägige differentielle Stimulation mit den in der Abb. dargestellten Stimuli. Die Proliferation der Zellen wurde durch Zugabe von 1 µCi ^{3}[H] Thymidin für 16 h und eine anschließende Analyse im Szintillationszähler gemessen. Die Werte stellen Mittelwerte von Vierfachwerten eines repräsentativen Experiments dar (n=6).

Um zu untersuchen, ob dieser Befund auch für eine Kostimulation via ICOS zutrifft, wurden CD4$^+$-

Zellen, analog zu *Wolf, H. et al., 1994*, 7 Tage lang mit einer maximalen Konzentration von anti-CD3 Ak stimuliert, wobei den Zellen an Tag vier, fünf und sechs neues Medium hinzugefügt wurde. Am Tag sieben wurden die Zellen vorsichtig abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und für 24 h ohne Stimulation in R10F+ inkubiert. Durch eine Trypanblaufärbung wurde die Zellviabilität und der Vermehrungsfaktor der Population untersucht. Die Anzahl der toten Zellen betrug regelmäßig ca. 20 %, der Vermehrungsfaktor schwankte stark in den fünf durchgeführten Experimenten, ist für die Fragestellung jedoch auch zu vernachlässigen, da mögliche Unterschiede zwischen dem ICOS Molekül und anderen Kostimuli untersucht werden sollten. Nach der Ruheperiode wurden die Zellen intensiv gewaschen und mit verschiedenen Kostimuli (anti-ICOS Ak, anti-CD28 Ak, IL-2 und PMA) restimuliert. Die dadurch induzierte Proliferation wurde nach drei Tagen bestimmt.

In Abb. 17 ist das Ergebnis eines solchen Proliferationsassays zu sehen. Es zeigte sich, daß die Restimulation nur über anti-CD3 Ak in dieser vorstimulierten Zellpopulation nicht mehr in der Lage ist, die maximal mögliche Proliferation zu induzieren, obwohl die eingesetzte anti-CD3 Ak Konzentration dies ermöglichte, sofern die Zellen nicht vorstimuliert worden waren. Der in Abb. 17 gemessene ^{3}[H] Thymidin Einbau ist um etwa 50% kleiner, als wenn die Zellen unter den gleichen Bedingungen ohne Vorstimulation stimuliert wurden. Die Ansprechbarkeit der Zellen auf diesen Stimulus wurde also durch die Vorstimulation deutlich eingeschränkt (siehe für ähnliche Befunde auch *Wolf, H. et al., 1994*). Durch die Kostimulation (unabhängig vom verwendeten Kostimulus) ist allerdings eine Verstärkung der Proliferation erreichbar. Die absoluten Werte und ihr Verhältnis untereinander sind dabei nur als ein Beispiel von fünf durchgeführten Experimenten anzusehen und nicht als absolute Reihenfolge. Die Potenz der einzelnen Kostimuli und die daraus resultierende Reihenfolge der Stärke der induzierten Proliferation schwankte in den fünf Experimenten.

Festzuhalten ist, daß die Kostimulation den Status der verminderten Ansprechbarkeit der Zellen aufhebt. Wie oben erläutert wurde dieser Effekt für CD28 bereits untersucht *[Boussiotis, V.A. et al., 1995, Noel, P.J. et al., 1996b]*. Für das CD28 Molekül wird dieses Phänomen als Verhinderung der durch Stimulation über das CD3 Molekül induzierten Anergie oder als Verhinderung des durch Aktivierung induzierten Zelltod ("activation induced cell death" = AICD) interpretiert.

5.3.2 Differentielle Kostimuli in der ersten Stimulationsphase – Langzeitstimulation über das ICOS Molekül

Parallel zu dem in 5.3.1 vorgestellten Ansatz wurde untersucht, wie sich eine Langzeitvorstimulation über das ICOS Molekül und eine daran angeschlossene Restimulation über das CD3 Molekül ohne Kostimulus auswirkt und ob sich auch hier Gemeinsamkeiten mit den Befunden, die durch andere Kostimuli erzielt wurden, ergeben.

Dabei wurden die Zellen wie in 5.3.1 stimuliert und gefüttert mit dem Unterschied, daß hier zusätzlich zur Maximalkonzentration an anti-CD3 Ak in der ersten Stimulationsphase, die Kostimuli (anti-ICOS Ak, anti-CD28 Ak, IL-2 oder PMA) hinzugefügt wurden, während in der zweiten Stimulationsphase eine Stimulation über das CD3 Molekül ohne Kostimuli erfolgte. Die Messung der Proliferation erfolgte nach drei Tagen Restimulation. Die löslichen Stimuli wurden bei den Fütterungen in der oben beschriebenen Konzentration hinzugefügt.

Tabelle 1: Der Wachstumsfaktor steht für die Vervielfachung der ursprünglich eingesetzten Zellzahl, wobei die toten Zellen nicht einberechnet wurden (Ausschluß via Trypanblaufärbung). 200 000 $CD4^+$-Zellen wurden pro Loch in einer 24-Loch Platte stimuliert. Der anti-CD3 Ak, anti-ICOS Ak und anti-CD28 Ak wurden auf den Platten immobilisiert, die löslichen Stimuli zu Beginn der Kultur hinzugefügt. (Konzentration IL-2: 20 U/ml, PMA: 5 ng/ml). An d 5, 6 und 7 wurde die Hälfte des Kulturmediums gegen frisches ausgetauscht, wobei die Konzentration der löslichen Stimuli durch Hinzufügen neuer Reagenzien beibehalten wurde. Dargestellt ist die Zählung der Zellen nach sieben Tagen Stimulation im Rahmen eines repräsentativen Experiments (n=6).

Zellstimuli	Anteil an toten Zellen (in %)	Wachstumsfaktor
anti-CD3 Ak	26	5,7
anti-CD3 Ak + anti-ICOS Ak	43	3,4
anti-CD3 Ak + anti-CD28 Ak	14	9,2
anti-CD3 Ak + IL-2	16	14,5
anti-CD3 Ak + PMA	18	5,5

Bereits die Zählung der Zellen und die Überprüfung ihrer Viabilität nach sieben Tagen vor der Restimulation und der eintägigen Ruheperiode ergab ein sehr variables Bild. Stellvertretend für eins von fünf durchgeführten Experimenten steht Tabelle 1.

Auffällig war zunächst v.a. der überproportional hohe Anteil an toten Zellen in der Population, die mit ICOS kostimuliert wurde. Dieses Ergebnis lag bei allen Experimenten um 50% während es für die anderen Zellpopulationen regelmäßig um 20% lag und zwischen den mit CD28, IL-2 oder PMA stimulierten Gruppen keine signifikant voneinander abweichenden Ergebnisse festgestellt werden konnten.

Der Wachstumsfaktor war absolut gesehen weniger konstant als der Anteil an toten Zellen, die relativen Unterschiede innerhalb der verschiedenartig stimulierten Populationen waren jedoch gleichbleibend: Die mit IL-2 kostimulierten Zellen erzielten regelmäßig die höchsten Zuwächse, gefolgt von der Population, die mit CD28 kostimuliert worden war. Signifikant niedrigere Zuwachsraten wurden durchgängig von denjenigen Zellpopulationen erzielt, die mit ICOS kostimuliert worden waren.

Im Anschluß an die 24-stündige Ruhephase wurde die Dichte der CD3 Expression in allen Zellpopulationen in der Durchflußzytometrie überprüft. Da in der ersten und der zweiten Stimulationsphase die Stimulation über einen anti-CD3 Ak erfolgte, hätte eine Herunterregulation des CD3 Moleküls – sofern sie durch die kostimulatorischen Agenzien unterschiedlich beeinflußt worden wäre – zu einer unterschiedlichen Stimulierbarkeit der Zellen in der zweiten Stimulationsperiode führen können. Dies konnte durch den Vergleich der CD3 Expressionsdichte der verschiedenen Zellpopulationen ausgeschlossen werden, die zeigte, daß die Expressionsdichte in allen Populationen nicht signifikant voneinander abwich (nicht gezeigt).

Abb. 18 zeigt die durch die Restimulation mit anti-CD3 Ak ausgelöste Proliferation der Zellen, die durch unterschiedliche Kostimuli vorstimuliert worden waren. Dabei stellen sich deutlich zwei verschiedene Reaktionsmuster der Zellen dar: Wurden die Zellen zuerst mit CD28 oder PMA

kostimuliert, dann sind die Zellen in der Lage als Reaktion auf den zweiten Stimulus, der nur über das CD3 Molekül vermittelt wird, zu proliferieren. Es ist v.a. darauf hinzuweisen, daß diese Antwort stärker ausfällt als die Proliferationsantwort, die diejenige Zellpopulation zeigt, die bereits als ersten Stimulus nur über CD3 stimuliert wurde und zwar um den Faktor 4 (1. Stimulation: Kostimulation mit PMA) bzw. Faktor 5 (1. Stimulation: Kostimulation mit CD28). Dies stellt somit ein Ergebnis dar, das den Ergebnissen anderer Untersuchungen entspricht (z.B. *Wolf, H. et al., 1994*), daß nämlich eine Kostimulation über CD28 das Eintreten von Anergie, das heißt die Nicht-Antwort von Zellen auf einen zweiten Stimulus, verhindert.

Andererseits scheinen bestimmte Formen der Kostimulation, eine entgegengesetzte Reaktion zu induzieren: Wurden die Zellen zuerst mit IL-2 oder anti-ICOS Ak kostimuliert, so reagierten sie deutlich weniger auf den zweiten Stimulus, als wenn sie konsekutiv zweimal über das CD3 Molekül stimuliert wurden. Die derart stimulierten Zellpopulationen zeigen also eher eine Proliferationsdepression. Diese Depression lag im dargestellten Beispiel um den Faktor 6 (1. Stimulation: Kostimulation über ICOS) bzw. 40 fach (1. Stimulation: Kostimulation über IL-2) niedriger als die durch konsekutive Stimulation über anti-CD3 Ak ausgelöste Proliferation (dies ist wieder nicht als absoluter Wert anzusehen).

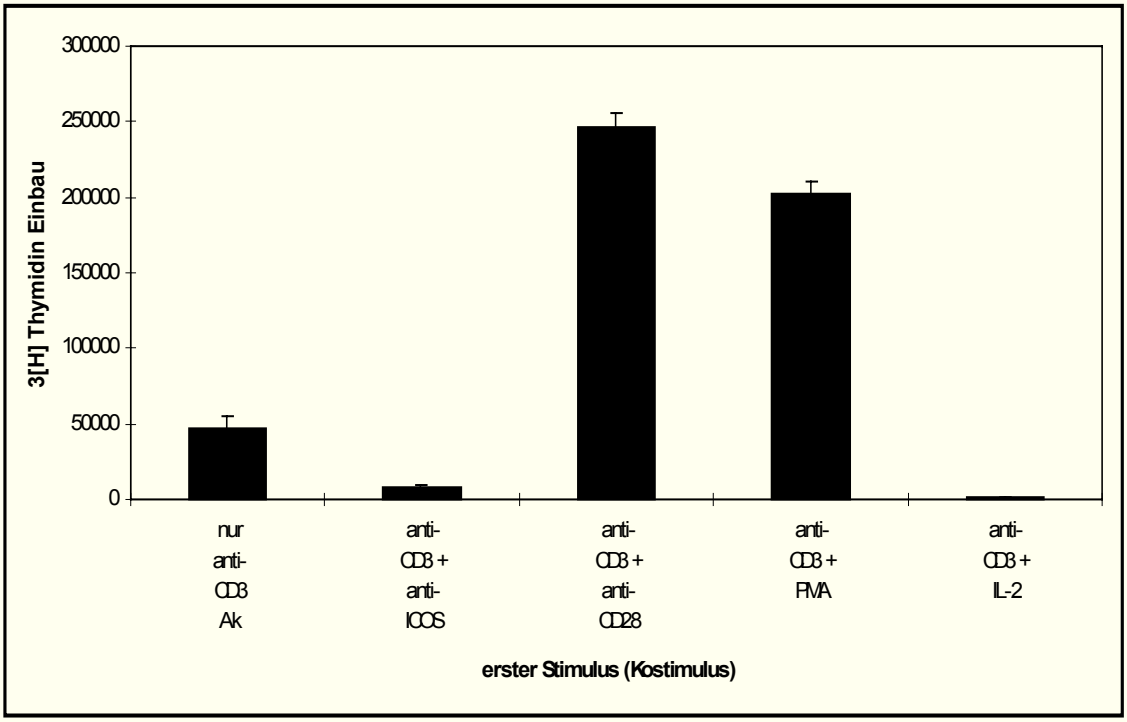

Abb. 18 **Proliferation durch Restimulation über anti-CD3 Ak nach unterschiedlichen Vorstimulationen.** 200 000 $CD4^+$-Zellen pro Loch wurden in den Löchern einer 24-Loch Platte mit den in der Abb. angegebenen Stimuli (Ak immobilisiert) sieben Tage lang stimuliert. An d 5, 6 und 7 wurde die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt, wobei die Konzentration der löslichen Stimuli (IL-2: 20 U/ml, PMA: 5 ng/ml) beibehalten wurde. Am d 7 wurden die Zellen abzentrifugiert und für 24 h auf Platten ohne Stimuli überführt. Danach erfolgte ein Transfer von jeweils 100 000 Zellen in die Löcher einer 96-Loch Platte, die mit anti-CD3 Ak beschichtet worden war. Die Zellen wurden zwei weitere Tage stimuliert, dann wurde ihnen 1 µCi ^{3}[H] Thymidin hinzugefügt und die Proliferation nach 16 h ^{3}[H] Thymidin Einbau durch Messung in einem Szintillationsgerät analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte aus Vierfachwerten eines unabhängigen, repräsentativen Experiments dar (n=6).

Interessant ist dieses Ergebnis v.a. insofern, als die über ICOS oder IL-2 stimulierten Zellpopulationen sich bezüglich der Zuwachsraten und des Anteils an toten Zellen nach sieben Tagen völlig entgegengesetzt verhielten. Die Zellviabilität der Kulturen, die über das ICOS Molekül stimuliert worden waren, war halb so groß wie die aller anderen Kulturen (s. obige Tabelle). Dieser Befund kann als Erklärung für die geringere Zuwachsrate sowohl in den ersten Kulturen (s. obige Tabelle), wie auch für die soeben vorgestellten Befunde nach Restimulation dienen. Die Kulturen, die mit IL-2 kostimuliert worden waren, zeigten jedoch eine durchschnittliche Absterberate und die größten Zuwächse aller Populationen nach sieben Tagen, diese Parameter deuten also nicht auf eine verminderte Viabilität hin, die sich in einer zweiten Stimulationsphase negativ auswirken würde. Somit stellt sich die Frage, ob sich die Ähnlichkeit bezüglich der Proliferationsdepression der mit ICOS oder IL-2 vorstimulierten Populationen auf einen gemeinsamen Faktor gründet oder ob dieser Befund durch zwei unterschiedliche Effekte zustande kommt.

5.3.3 Differentielle Kostimulation in der ersten und in der zweiten Stimulationsphase

Um die oben dargestellten Fragen und Befunde zu klären, wurde im Anschluß an die Versuchsreihen 5.3.1 und 5.3.2 in dem vorgestellten System untersucht, ob die Kostimulation über ICOS in der ersten Stimulationsphase eine generelle Depression der Zellen bewirkt bzw. ob Kostimuli in der Restimulationsphase diese unterdurchschnittliche Proliferation aufheben können. Gleichzeitig sollte auch in diesen Versuchen wieder der Vergleich mit den anderen Kostimuli (CD28, IL-2 und PMA) angestellt werden. Die Zellen wurden zu diesem Zweck in beiden Phasen mit unterschiedlichen Kostimuli aktiviert, so daß sich das in Abb. 19 zu sehende komplexe Muster von erstem und zweitem Kostimulus ergibt.

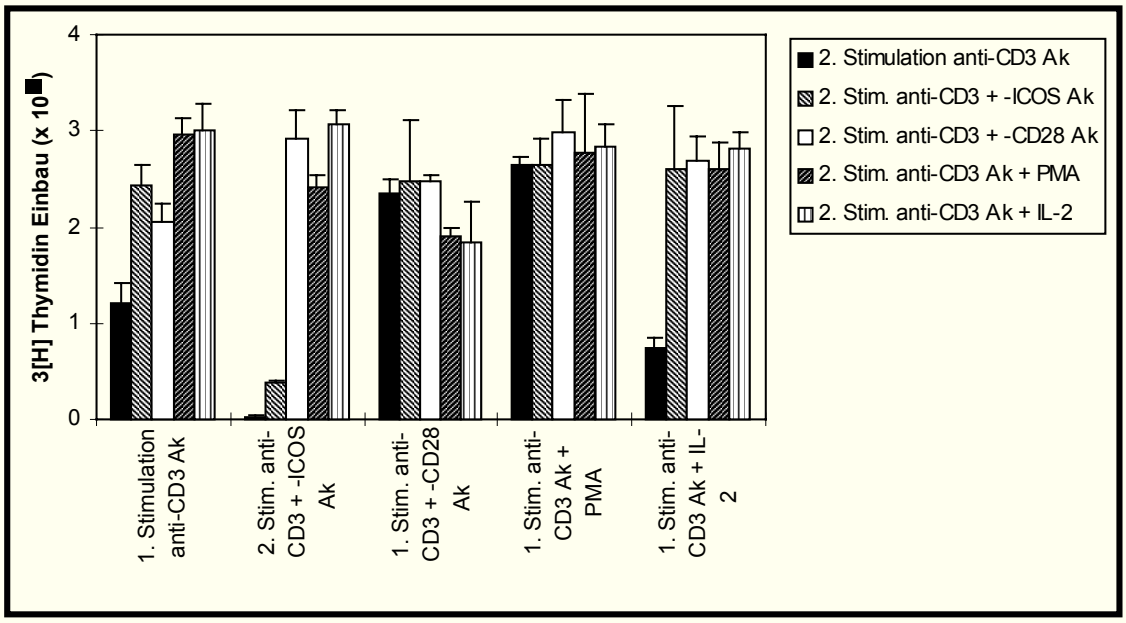

Abb. 19 **Differentielle Vorstimulation und Restimulation durch ICOS und andere kostimulatorische Moleküle.** 200 000 $CD4^+$-Zellen pro Loch wurden in den Löchern einer 24-Loch Platte mit den in der Abb. angegebenen 1. Stimuli (Ak immobilisiert) sieben Tage lang stimuliert. An d 5, 6 und 7 wurde die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt, wobei die Konzentration der löslichen Stimuli (IL-2: 20 U/ml, PMA: 5 ng/ml) beibehalten wurde. Am d 7 wurden die Zellen abzentrifugiert und für 24 h auf Platten ohne Stimuli überführt. Danach erfolgte ein Transfer von jeweils 100 000 Zellen in die Löcher einer 96-Loch Platte, die mit anti-CD3 Ak und den in der Legende aufgeführten Kostimuli versehen war (=2. Stimulus) (alle Ak immobilisiert). Die Zellen wurden zwei weitere Tage stimuliert, dann wurde ihnen 1 µCi ^{3}[H] Thymidin hinzugefügt und die Proliferation nach 16 h ^{3}[H] Thymidin Einbau durch Messung in einem Szintillationsgerät analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte aus Vierfachwerten eines unabhängigen, repräsentativen Experiments dar (n=3).

In Abb. 19 ist erstens festzustellen, daß die Zellpopulationen, die mit PMA oder CD28 vorstimuliert wurden, unabhängig vom in der zweiten Stimulationsphase verwendeten Stimulus, immer eine ausgeprägte Proliferation zeigen. Zweitens scheint die in 5.3.2 geschilderte verringerte Proliferation der Kulturen, die mit IL-2 vorstimuliert wurden, an den Entzug des IL-2 und den Mangel an anderen Kostimuli gekoppelt zu sein. Wird die Zellpopulation erneut mit IL-2 oder den anderen verwendeten Kostimuli stimuliert, so ist auch diese Zellpopulation in der Lage, auf die Stimulation mit einer deutlichen Proliferation zu reagieren. Drittens ist auffällig, daß diejenigen Zellen, die mit ICOS vorstimuliert wurden, durch eine Kostimulation über CD28, IL-2 oder PMA proliferieren und zwar in vergleichbarer Stärke wie die Zellpopulationen, die durch andere Kostimuli vorstimuliert worden waren. Lediglich die Restimulation über das CD3 Molekül alleine oder in Kombination mit anti-ICOS Ak als Kostimulus führen zu der in 5.3.2 dargelegten Proliferationsdepression.

6 Diskussion

6.1 Die Expression des ICOS Moleküls ist abhängig von zwei Signalen

Die in 5.1 dargestellten Versuche zeigen deutlich, daß die Expression des ICOS Moleküls zweisignalabhängig ist. Die geringe Expressionsstärke, die sich durch alleinige Stimulation mit PMA oder Ionomycin erzielen ließ, stieg auch durch eine längere Stimulation (gezeigt bis 24 h) nicht auf das Niveau der Expression an, das sich nach Stimulation durch PMA und Ionomycin einstellte. Es muß also davon ausgegangen werden, daß eines der Signale nicht zur vollständigen Aktivierung des intrazellulären Signalwegs ausreicht, durch den die ICOS Expression gesteuert wird. Die Hypothese der Zweisignalabhängigkeit der ICOS Expression wird durch die Befunde der Stimulation via anti-CD3 Ak und PHA P unterstützt, da diese Stimulationsbedingungen eher der Stimulation durch ein einziges Signal entsprechen. Auch die hier nicht gezeigten Befunde, daß eine maximale ICOS Expression durch Kostimulation via CD28 und anti-CD3 Stimulation erreicht wird, sprechen für diese Interpretation.

Aufgrund dieser Befunde läßt sich außerdem postulieren, daß für die Induktion des ICOS Moleküls ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg notwendig ist, der einerseits die Proteinkinase C aktiviert und zusätzlich vom Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} abhängig ist. Untermauert wird dies durch die Ergebnisse, daß die Induktion des ICOS Moleküls CsA sensitiv ist. Ohne die Funktion des Calcineurin Moleküls, die vom Anstieg des intrazellulären Kalziums abhängig ist, ist die ICOS Expression drastisch eingeschränkt (Abb. 3). Weitere Versuche mit Inhibitoren, die selektiv bestimmte intrazelluläre Prozesse der T-Zellaktivierung hemmen, werden notwendig sein, um detaillierter zu analysieren, welche Prozesse zur Expression des ICOS Moleküls führen. Es ist jedoch deutlich geworden, daß die Expression des ICOS Moleküls eng reguliert ist, enger als die Expression derjenigen Moleküle, deren Expression bereits durch ein Signal induziert werden kann. Bezogen auf die in vivo Situation deutet diese Tatsache an, daß es sich bei dem ICOS Molekül um ein Molekül handelt, dessen Funktion sehr spezifisch begrenzt werden muß, um zu verhindern, daß eine Funktionsausübung unter inadäquaten Bedingungen zur Fehlfunktion des Immunsystems führt.

Auch die frühzeitige Expression des ICOS Moleküls, die durch die Expressionsstudien bestätigt und präzisiert werden konnte, weist indirekt darauf hin, daß das ICOS Molekül in der Lage ist, entscheidenden Einfluß auf die Funktionen des Immunsystems zu nehmen. Denn die Moleküle, die früh während einer Immunantwort induziert werden, sind in der Lage, entscheidende Weichen für die in dieser Immunantwort stattfindenden Prozesse zu stellen.

6.2 Das ICOS Molekül hat kostimulatorische Wirkungen auf viele Parameter und induziert durch Kostimulation ein ICOS spezifisches Muster an Effekten

Durch die in 5.2 beschriebenen Ergebnisse konnte der Befund, daß das ICOS Molekül ein kostimulatorisches Molekül darstellt, um eine Reihe von Informationen zu dieser kostimulatorischen Wirkung und den Funktionen auf die sie sich auswirkt, erweitert werden. Zunächst konnte in 5.2.1 gezeigt werden, daß die kostimulatorische Wirkung des anti-ICOS Antikörpers konzentrationsabhängig ist. Die Konzentrationsabhängkeit kann im Umkehrschluß als Indiz für die bereits geäußerte Vermutung gewertet werden, daß die Stärke der kostimulatorischen Wirkung proportional der ICOS Expressionsdichte ist. Eine geringe Menge des anti-ICOS Ak kann u.U. nicht

alle exprimierten ICOS Moleküle ligieren, so daß eine geringere Expressionsdichte simuliert wird als tatsächlich vorhanden ist. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß die Ligation des ICOS Moleküls seine eigene Expression und damit die über ICOS vermittelten Effekte hochreguliert. Eine geringere Menge des anti-ICOS Ak würde dann zu einer geringeren ICOS Expression führen, über die nur geringere kostimulatorische Effekte erzeugt werden könnten. Diese möglichen Wirkungsmechanismen müssen noch genauer analysiert werden.

Neben dem klassischen Kostimulationsparameter Proliferation konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, daß eine Reihe weiterer Parameter der T-Zellaktivierung und -funktion durch Kostimulation via ICOS beeinflußt werden. Der dabei z.T. erfolgte Vergleich mit den Ergebnissen, die durch Kostimulation via CD28 zu erzielen sind, ermöglicht einerseits eine Einschätzung der Potenz der Kostimulation durch ICOS. Andererseits zeigen diese Befunde, daß das ICOS Molekül spezifische Wirkungen bei der Kostimulation initiiert, die sich von den Wirkungen durch CD28 Kostimulation deutlich unterscheiden. Sie erlauben daher davon auszugehen, daß das ICOS Molekül eine spezifische Rolle im Immunsystem inne hat, die über eine bloße Redundanz hinausgeht.

Generell gilt dabei für die Versuche, daß sie mit anti-CD3 Antikörpern als erstem Stimulus durchgeführt wurden. Diese wurden z.T. suboptimal eingesetzt (Oberflächenmolekülexpression, Proliferation, Immunglobulinsynthese), z.T. in optimaler Konzentration verwandt (Zytokinsekretion und Langzeitstimulation/Induktion von Anergie). Dabei entspricht die suboptimale Konzentration des anti-CD3 Ak am ehesten der in vivo Situation, in der die Menge des Antigens gering ist. Die Versuche, in denen eine Verstärkung der gemessenen Parameter auch bei optimalen anti-CD3 Ak Konzentrationen meßbar war, unterstreichen die Potenz der kostimulatorischen Effekte des ICOS Moleküls, welches anscheinend in der Lage ist, selbst unter dieser maximalen Stimulation noch zusätzliche intrazelluläre Effekte zu induzieren.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß die kostimulatorische Fähigkeit des ICOS Moleküls nicht davon abhängig ist, daß der 1. Stimulus durch anti-CD3 Ak erfolgt. Analog zu Versuchen für CD27 *[Kobata, T. et al., 1994]*, CD28 *[Baroja, M.L. et al., 1989, Thompson, C.B. et al., 1989]* und LFA-3 *[Sansom, C.M. et al., 1993]* ließ sich darstellen, daß das ICOS Molekül auch mit löslichem 1. Stimulus (PHA P) in der Lage ist, kostimulatorisch zu wirken. Der Verstärkungsfaktor, der gemessen werden konnte, ist sowohl für ICOS, wie auch für CD28, deutlich geringer als bei einer Initialstimulation mit anti-CD3 Ak. Dies ist jedoch u.U. auf den in *Liu, Y. and Janeway, 1992* vorgestellten Befund zurückzuführen, daß eine optimale Kostimulation die Koexpression des ersten und des kostimulatorischen Signals auf den APC voraussetzt. Diese Koexpression entspricht vielleicht eher der Koimmobilisierung von anti-CD3 Ak und anti-kostimulatorischem Molekül Ak auf einer Platte, als der Wirkung des ersten Signals über ein lösliches Molekül, wie PHA P und der Kostimulation über den immobilisierten Ak. Daneben trifft für das ICOS Molekül außerdem zu, daß seine Expression durch anti-CD3 Ak besser als durch PHA P zu induzieren ist (Abb. 4 und 5). Der geringere kostimulatorische Effekt könnte also auch darauf zurückzuführen sein, daß durch die Stimulation via PHA P zu wenig ICOS Moleküle induziert werden, um einen stärkeren kostimulatorischen Effekt zu initiieren. Dies ist jedoch im Hinblick auf die ähnlichen Ergebnisse für das CD28 Molekül unwahrscheinlich. Eher scheint es möglich, daß die Wirkungsweise von PHA P, das Glykoproteine kreuzvernetzt, die Ursache

dieses Effekts darstellt. Die unspezifische Kreuzvernetzung durch PHA P, führt u.U. bereits zur Kreuzvernetzung einiger ICOS oder CD28 Moleküle, so daß die zusätzliche Kreuzvernetzung über die mAk keine starke Steigerung mehr induzieren kann. Möglicherweise liegt diesem Phänomen auch zugrunde, daß die Signaltransduktion über ein kostimulatorisches Molekül über Eingriffe in die vom ersten Signal ausgelösten Signaltransduktionsprozesse wirkt und dadurch die gemessenen Parameter verändert. Die Expressionsstärke der Parameter, die als Maß für den kostimulatorischen Effekt herangezogen werden, ist also immer auch davon abhängig, inwieweit durch das untersuchte kostimulatorische Molekül in die Signaltransduktionswege eingreifen werden kann, die vom ersten Signal ausgelöst wurden. Dies ist u.U. bei den durch PHA P ausgelösten Signalwegen schlechter möglich, wofür auch spricht, daß auch die kostimulatorische Wirkung von CD28 unter diesen Bedingungen schwächer ist als bei Experimenten, in denen das erste Signal über anti-CD3 Ak vermittelt wird. Weitere Untersuchungen, v.a. bezüglich der intrazellulären Signalwege müßten erfolgen, um diese Hypothesen genauer zu untersuchen.

Der Versuch, das Ergebnis der Kostimulation mit einem weiteren löslichen Stimulus, nämlich PMA zu reproduzieren, wie dies für CD5 oder CD28 möglich ist *[Alberola-Ila, J. et al., 1992, Thompson, C.B. et al., 1989]*, scheiterte jedoch. Da die Konzentration von PMA (und auch PHA P) in Vorexperimenten über einen weiten Bereich austitriert worden war, um den Bereich zu finden, in dem die kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls optimal darzustellen war, konnte eine Konzentrationsabhängigkeit nicht Ursache dieser ausbleibenden Wirkung sein. Wahrscheinlich ist dieser Befund für ICOS darauf zurückzuführen, daß die Expression des ICOS Moleküls durch PMA nur schlecht zu induzieren ist, während dies für CD28 als konstitutiv exprimiertem Molekül nicht notwendig ist (siehe hierzu 5.1, Abb. 1). Anscheinend reicht die Ligation der wenigen ICOS Moleküle, die durch Stimulation mit PMA induziert werden, nicht aus, um den intrazellulären Ca^{2+}-Spiegel auf das Niveau zu erhöhen, das für die Proliferation der T-Zellen notwendig ist. Möglich scheint aber auch, daß das ICOS Molekül nicht in der Lage ist, das intrazelluläre Ca^{2+} zu erhöhen, unabhängig von seiner Expressionsstärke. Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+}, der für die Aktivierung der T-Zelle essentiell ist, müßte also durch das erste Signal vermittelt werden, wenn eine Kostimulation via ICOS zu einer Aktivierung der T-Zelle führen soll. Das verwendete PMA erhöht jedoch kein Ca^{2+}. Für diese Überlegung sprechen auch Befunde, daß die Transkription des IL-2 Gens neben der Aktivierung der Proteinkinase C vom Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} abhängig ist *[Ho, N. et. al., 1996, Schwartz, R.H., 1990]*, und diese Transkription durch Kostimulation via ICOS nicht zu induzieren ist (siehe hierzu 5.2.2.2, Abb. 10 und unten). Diese Annahme müßte jedoch durch zusätzliche Versuche überprüft werden, die gezielt die Ca^{2+}-Mobilisation und dabei involvierte Moleküle nach ICOS Ligation untersuchen.

Entscheidend sind diese Befunde trotz der noch bestehenden Unklarheiten, da sie zeigen, daß das ICOS Molekül seine kostimulatorische Wirkung nicht über eine verstärkte Bindung der Zellen an die CD3 Ak vermittelt, also nicht nur ein sogenanntes „tethering“ ausübt. Es scheint vielmehr durch die Ligation des ICOS Moleküls ein Prozeß initiiert zu werden, der spezifisch in Signalwege eingreift, die durch das 1. Signal ausgelöst werden. Die Vorstellung, daß durch die Kostimulation via ICOS ein spezifischer Signalweg entsteht, wird durch die Befunde bezüglich der Zytokinsekretion und der

Induktion der Anergie gestützt. Bezogen auf diese Parameter, entstehen durch die Kostimulation via ICOS charakteristische Ergebnisse, die die Kostimulation durch dieses Molekül von kostimulatorischen Effekten durch andere Moleküle unterscheidet.

Die T-Zellproliferation stellt einen notwendigen Vorgang bei der Initiation der Immunantwort dar, da die Anzahl der Ag spezifischen T-Zellen viel zu klein ist, um eine adäquate T-Zellhilfe zu leisten *[Schwartz, R.H., 1990]*. Voraussetzung und Vorboten der T-Zellproliferation sind eine Reihe ganz charakteristischer Veränderungen von Phänotyp und Funktion der T-Zelle. Die Untersuchung der Auswirkung der Kostimulation durch das ICOS Molekül auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CD40L, zweier Moleküle, die charakteristischerweise früh nach der T-Zellaktivierung induziert bzw. hochreguliert werden, stellt einen ersten Anhaltspunkt für die Funktion und Wirkungsweise des ICOS Moleküls dar.

Die Hochregulation von CD25 ist für die T-Zelle notwendig, um auf den auto- und parakrin wirkenden Wachstumsfaktor IL-2 mit einer Proliferation zu antworten *[Schwartz, R.H., 1990]*. Die Kostimulation via ICOS scheint der Zelle dieses zu ermöglichen, da eine beträchtliche Hochregulation des IL-2 Rezeptors induziert wird. Die Hochregulation des Oberflächenmoleküls CD25 ermöglicht es also, vorsichtige Rückschlüsse auf die Grundlagen der Proliferation zu ziehen, die durch das ICOS Molekül induziert wird. Die Implikationen und Schwierigkeiten, die diese Hypothese im Hinblick auf die Ergebnisse bezüglich der Induktion der IL-2 Sekretion darstellt, werden im Rahmen der Diskussion der Zytokinsekretion analysiert werden.

Durch die Untersuchung des Phänotyps, der durch die ICOS Kostimulation induziert wird, konnte erstmalig auch auf Funktionen des ICOS Moleküls geschlossen werden, die das Molekül für das Zusammenspiel der Immunzellen bei der in vivo Immunantwort hat. Verschiedenste Arbeiten der letzten Jahre haben zeigen können, daß die T-Zellhilfe für die B-Zelle von der Interaktion des CD40-CD40L Ligandenpaares abhängig ist, und daß sogar eine direkte Korrelation zwischen CD40L Expression der T-Zelle und der erreichten B-Zellhilfe besteht *[De Boer, M. et al., 1993, Klaus, S.J. et al., 1994, Kwekkeboom, J. et al., 1994]*. Die durch das ICOS Molekül induzierbare CD40L Expression könnte hierbei u.U. die gleiche Funktion haben, wie dies für das CD28 Molekül gezeigt werden konnte: Erst die Kostimulation via CD28 kann demnach eine adäquate CD40L Expression induzieren, die wiederum die Grundlage der T-Zellhilfe für die B-Zellen ist.

Reziproke, sequentielle Interaktionen bei der Aktivierung von T- und B-Zellen sind aufgrund der vielfältigen Befunde zur Interaktion der beiden Aktivierungswege in den letzten Jahren oft vorgeschlagen worden *[Clark, E.A. and Lane, P.J., 1991, Clark, E.A. and Ledbetter, J.A., 1994, Lenschow, D.J. et al., 1996, Van Gool, E.A. et al., 1996]*. Im Rahmen der hier gezeigten Befunde könnte das ICOS Molekül ein Bindeglied in dieser reziproken B-Zell-T-Zellaktivierungskaskade darstellen: Die frühe Induktion und folgende Stimulation über das ICOS Molekül könnte zur Hochregulation von CD40L auf den T-Zellen führen, die wiederum für die CD40-CD40L Interaktion notwendig ist, welche schließlich zur Hochregulation von CD80/CD86 führt und die Adhäsion über LFA-1 (Leucocyte funktion-associated antigen-1) verstärkt *[Lenschow, D.J. et al., 1996, Splawski, J. et al., 1993, Van Gool, E.A. et al., 1996]*. Über die CD28/B7, ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-

1)/LFA-1 und CD40/CD40L Interaktion könnte dann die T-Helferfunktion so gesteigert werden, daß letztlich die Induktion der Immunglobulinsekretion resultiert *[Damle, N.K. et al., 1991, Jenkins, M.K. et al., 1994, Kwekkeboom, J. et al., 1994* und *Splawski, J. et al., 1993]*. Für diese These spricht auch die Tatsache, daß das ICOS Molekül sehr früh im Rahmen der T-Zellaktivierung exprimiert wird. Einige Studien zur CD28/B7 Interaktion zeigen, daß die frühe T-Zellaktivierung auch ohne CD28/B7 Interaktion zur T-Zellaktivierung führt, bzw. daß die Kostimulation durch CD28 wohl v.a. zu einem späteren Zeitpunkt der T-Zellaktivierung relevant ist *[Van Gool, E.A. et al., 1996, Zhang, Y.-Q., 1997]*. Somit scheint es durchaus möglich, daß die Kostimulation via ICOS zu einem früheren Zeitpunkt als das CD28 Molekül die T-Zelle aktiviert und in eine bestimmte Differenzierungsrichtung lenkt.

Letztlich wird diese Annahme auch durch die Ergebnisse bezüglich der Immunglobulinsekretion gestützt. Die Ergebnisse in 5.2.2.3 zeigen, daß das ICOS Molekül potentiell in der Lage ist, eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer humoralen Immunantwort zu spielen. In den in 5.2.2.3 gezeigten Versuchen wird deutlich dargestellt, daß unter den dort herrschenden Bedingungen allein die Kostimulation via ICOS (oder CD28) in der Lage ist, eine Immunglobulinsekretion zu induzieren, daß diese also vollkommen abhängig von dieser Kostimulation ist. Dieser kostimulatorische Effekt wurde bisher nur für die Moleküle CD28 und OX40 *[Stüber, E. and Strober, W., 1996]* gezeigt, scheint aber kein Parameter zu sein, der durch alle kostimulatorischen Moleküle beeinflußt wird, wie z.B. die Proliferation. Unterstützt wird die Hypothese, daß die Kostimulation via ICOS entscheidend an der Induktion der humoralen Immunantwort beteiligt ist, auch durch die histologischen Untersuchungen der Expression in vivo. Die starke Expression des ICOS Moleküls im Keimzentrum der sekundären lymphatischen Gewebe, wo eben diese B-Zellhilfe durch die CD40-CD40L-Interaktionen geleistet wird, stellt einen Anhaltspunkt dafür dar, daß diese ICOS Funktion auch in vivo ausgeübt werden könnte.

Zusätzlich deuten auch die Ergebnisse der durch Kostimulation erzielten Zytokinsekretion an, daß die Kostimulation via ICOS einen entscheidenden Schritt bei der Induktion der humoralen Immunantwort darstellt. Das ICOS Molekül induziert eine signifikante Menge von IL-4 und steigert die Sekretion von IL-5 (wenn auch erst nach 48 h) um den Faktor 5. Beide Moleküle wurden ursprünglich als BCGFs (B cell growth factors) bzw. BCSFs (B cell stimulating factors) bezeichnet *[Sideras, P. et al., 1988]*, stellen also Zytokine dar, deren Wirkung zur Induktion der Immunglobulinsekretion führen kann. Wenn auch einige Studien zeigen, daß die Induktion von IL-2 eine Voraussetzung für die B-Zellproliferation und Differenzierung darstellt (andere verneinen diese Notwendigkeit allerdings auch) *[Bich-Thuy, L.T., 1990, Jelinek, D.F. et al., 1986]* und dieses Zytokin durch Kostimulation durch ICOS nicht induziert werden konnte (s. 5.2.2.2 und unten), so ist unter den Bedingungen der Kokultur von T- und B-Zellen nicht ausgeschlossen, daß es zur IL-2 Sekretion kommt: Schließlich ermöglicht diese Situation die Interaktion zwischen CD28 auf den T-Zellen und CD80/CD86 auf den B-Zellen, die in der Lage ist, die IL-2 Sekretion zu induzieren *[Thompson, C.B. et al., 1989]*. Demnach stellt die Kostimulation via das ICOS Molekül in der T/B Kokultur eine Situation dar, in der sowohl die membranständigen, wie auch die löslichen Moleküle optimal induziert werden können, die für die Differenzierung der B-Zelle notwendig sind, was sich letztlich in der in Abb. 14 gezeigten Induktion der Immunglobulinsekretion darstellt.

Aber auch das Expressionsmuster der anderen Zytokine, die untersucht wurden, d.h. das Muster der

Expression von IL-2, IFN-γ und ATAC, deutet interessante Effekte der Kostimulation durch ICOS an. Daß die Kostimulation via ICOS keine meßbare IL-2 Sekretion induziert, stellt ein zunächst überraschendes Ergebnis dar, wenn man die Effekte der Kostimulation auf die Proliferation betrachtet und davon ausgeht, daß IL-2 den wichtigsten T-Zellwachstumsfaktor darstellt. Da auch nach einer zusätzlichen Inkubationszeit von weiteren 24 h keine Veränderung der nach den ersten 24 h gemessenen Werte beobachtet wurde, erscheint es unwahrscheinlich, daß dieses Ergebnis darauf zurückzuführen ist, daß das ICOS Molekül, als induzierbares Molekül später wirkt als z.B. das CD28 Molekül. Weiterhin spricht dagegen, daß die verwendete anti-CD3 Ak Konzentration maximal war und somit einer Konzentration entsprach, die nach 12 h bereits eine deutliche ICOS Expression induzieren konnte (Abb. 5). Die ICOS Expression konnte also keinen limitierenden Faktor darstellen. Drittens ist das ICOS Molekül in der Lage bereits nach 12 h die Expression von CD40L oder CD25 deutlich zu beeinflussen und reguliert die Sekretion von IL-4 und IFN-γ nach 24 h herauf, so daß nicht davon ausgegangen werden kann, daß die Wirkung der Kostimulation des ICOS Moleküls generell erst zu einem späteren Zeitpunkt zu detektieren ist. Schließlich ist zu konstatieren, daß dieser Umstand wohl für IL-5 zutrifft, das erst nach 48 h deutlich durch die ICOS Kostimulation beeinflußt wird; ein Effekt, der für IL-2 nach 48 h allerdings nicht zu beobachten ist. Eine noch spätere Hochregulation (etwa nach 72 h), erscheint unwahrscheinlich, bzw. zumindest als Grundlage für die gemessene T-Zellproliferation eher irrelevant zu sein, da diese durch den Einbau von ^{3}[H] Thymidin zwischen 58 und 72 Stunden Kulturdauer gemessen wurde. Die Diskrepanz zwischen geringer IL-2 Sekretion einerseits und starker Proliferation andererseits zeigt sich auch in Experimenten mit anderen kostimulatorischen Molekülen *[Sunder-Plassman, R. et al., 1995, Van Seventer, G. et al., 1990]*. Es bieten sich hierfür unterschiedliche Erklärungen an: Es wäre möglich, daß die induzierte Proliferation durch andere Zytokine oder ein Gemisch anderer Zytokine induziert (z.B. IL-4, -7, -12) wird. Da das ICOS Molekül in der Lage ist, eine Reihe von Zytokinen zu induzieren oder hochzuregulieren, wäre diese Funktionsweise durchaus denkbar. Andererseits wäre es auch möglich, daß das ICOS Molekül eine sehr geringe Menge von IL-2 induziert, die durch den verwendeten IL-2 ELISA nicht bestimmt werden konnte, zumal das sezernierte IL-2 möglicherweise sofort von den Zellen konsumiert wird. Diese Menge könnte aber ausreichend sein, um eine IL-2 abhängige Proliferation zu induzieren, vielleicht unterstützt dadurch, daß durch das ICOS Molekül die IL-2 Rezeptordichte stark heraufreguliert wird, so daß die Wirkung der geringen IL-2 Mengen sehr effizient ist. Die Abhängigkeit der kostimulatorischen Wirkung einiger Moleküle von der Heraufregulation des IL-2 Rezeptors wird auch von *Damle, N.K. and Aruffo, A., 1990* und *Van Seventer, G. et al., 1990* gezeigt. Diese Hypothesen wären durch eine gezielte Blockade des IL-2 oder des IL-2 Rezeptors relativ einfach zu untersuchen, so daß aufgeklärt werden könnte, über welche Faktoren das ICOS Molekül die Proliferation der T-Zellen beeinflußt.

Während das ICOS Molekül die Sekretion von IL-2 wohl nicht beeinflußt, ist sein Einfluß auf die Sekretion von IFN-γ und ATAC überaus stark. Die Verstärkung der Sekretion dieser beiden Moleküle ist quantitativ durchaus mit der Wirkung des CD28 Moleküls gleichzusetzen. Nach 48 bzw. 51 h liegen die sezernierten Mengen beider Moleküle in einem ähnlichen Bereich, unabhängig davon, ob die Kostimulation über das ICOS Molekül oder über das CD28 Molekül erfolgte. Die nach 24 h noch schwächere Verstärkung durch das ICOS Molekül kann darauf zurückgeführt werden, daß die zu

diesem Zeitpunkt exprimierte Menge der ICOS Moleküle noch zu gering ist, um einen maximalen Effekt zu erzielen. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß auch das auf $CD8^+$-Zellen exprimierte ICOS kostimulatorische Funktion besitzt. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, daß die Kostimulation über das ICOS Molekül auch Signale induziert, die die zelluläre Immunabwehr steuern.

Die analysierten Ergebnisse bezüglich der Zytokinsekretion unterscheiden das ICOS Molekül deutlich von anderen kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD28 *[Thompson, C.B. et al., 1990]*, CD5 *[Alberola-Ila, et al., 1992]*, CD26 *[Dang, N.H. et al., 1990]*, ICAM oder VCAM (Vascular cell adhesion molecule) *[Damle, N.K. et al., 1992b]*, die ein anderes Zytokinmuster induzieren. Vergleichende Studien von ICAM und einerseits und B7 und LFA-3 andererseits haben allerdings gezeigt, daß deren kostimulatorische Wirkung vom Aktivierungs- und Differenzierungsstatus der T-Zellen abhängig ist. ICAM und VCAM induzieren IL-2 Sekretion von ruhenden T-Zellen während B7 und LFA-3 bevorzugt Ag sensibilisierte T-Zellen stimulieren *[Damle, N.K. et al., 1992b]*. Auch für CD27 konnte die bevorzugte Stimulation einer Subpopulation von T-Zellen gezeigt werden *[Kobata, T. et al., 1994]*. Diese Möglichkeit ist für das ICOS Molekül bis jetzt noch nicht untersucht worden. Sie stellt eine interessante Erklärungsmöglichkeit für die Redundanz der kostimulatorischen Moleküle dar. Über die Vielfalt der kostimulatorischen Moleküle könnte somit eine differentielle Stimulation erfolgen, durch die je nach Aktivierungs- und Differenzierungsstatus und möglicherweise nur innerhalb einer ganz bestimmten Mikroumgebung bestimmte T-Zellsubpopulationen stimuliert würden. Diese Hypothese wird bereits in einigen Reviews und Arbeiten diskutiert *[Kuiper, H.M. et al., 1995, Liu, Y. and Linsley, P.S., 1992, Palmer, E.M. and van Seventer, G.A., 1997]*. Andererseits ähneln bestimmte Aspekte des ICOS Zytokinmusters auch den Effekten, die durch andere kostimulatorische Moleküle erzielt werden. So bewirkt das CD27 Molekül z.B. keine IL-2 Sekretion, aber eine starke IFN-γ Sekretion *[Kobata, T. et al., 1994, Sunder-Plassman, R. et al., 1995].* Eine ähnlich starke Wirkung auf die IFN-γ Sekretion hat auch das SLAM Molekül (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) *[Aversa, G. et al.,1997, Cocks, B.G. et al., 1995]*.

Es ist durch diese Untersuchungen außerdem deutlich geworden, daß die Kostimulation durch das ICOS Molekül die T-Zellen nicht in eine bestimmte Differenzierungsrichtung lenkt. Die Kostimulation via ICOS induziert kein Zytokinmuster das typisch wäre für eine zellvermittelte Immunantwort im Sinne einer T-Helfer Typ 1 Antwort (Th1 Antwort) oder einer verstärkt humoral/antiparasitisch ausgerichteten Reaktion im Sinne einer T-Helfer Typ 2 Antwort (Th2 Antwort). Dies wird von einigen Molekülen, in einigen Studien berichtet *[Del Prete, G. et al., 1995, Freeman, G.J. et al., 1995, King, C.L. et al., 1995, Palmer, E.M. and van Seventer, G.A., 1997, Shanafelt, M.C. et al., 1995]*. Diese Befunde werden jedoch auch kontrovers diskutiert *[Corry, D.B. et al., 1994, Levine, B.L. et al., 1995, Tivol, E.A. et al., 1996]*. Einerseits ist es nicht ausgeschlossen, daß solche Effekte auch für das ICOS Molekül beobachtet werden könnten, wenn die Stimulationsbedingungen ähnlich gewählt würden, wie in den zitierten Arbeiten. Andererseits ist es auch möglich, daß das ICOS Molekül eher Zellen stimuliert, die noch nicht den Th1 oder Th2 Pfad beschritten haben, bzw. vielleicht auch gar nicht weiter differenzieren können, da ihnen das dafür notwendige IL-2 fehlt. Oder aber die Stimulation durch das ICOS Molekül stimuliert zwei Subpopulationen von Zellen, von denen die eine IFN-γ sezerniert, die andere IL-4 und IL-5. Diese Hypothesen, die einander nicht vollkommen ausschließen, werden in

Zukunft durch spezifischere Experimente, die die Zytokinsekretion beleuchten, möglicherweise auch auf Einzelzellniveau, untersucht werden müssen, um die Funktion des ICOS Moleküls bei der Immunantwort in vivo besser verstehen zu können.

Die oben angeführten Befunde einer präferentiellen Stimulation von Th1 oder Th2 Zellen, bzw. der Induktion des einen oder anderen Entwicklungswegs werden in vielen Arbeiten als Erklärung angeführt, warum eine Vielzahl von kostimulatorischen Molekülen exprimiert wird *[Liu, Y. and Linsley, P.S., 1992]*. Ausgehend von den bis jetzt erzielten Ergebnissen bezüglich der Kostimulation durch das ICOS Molekül kann dieser Befund nicht herangezogen werden, um die Notwendigkeit für Existenz des ICOS Moleküls zu erklären. Es zeigte sich, daß bezüglich der Proliferation, der Heraufregulation von CD25 und CD40L und der Immunglobulinsekretion (s. 5.2.2.1 bis 3) höchstens quantitative Unterschiede bezüglich der kostimulatorischen Wirkung von CD28 und ICOS bestehen. Beide Moleküle induzieren Proliferation, regulieren CD25 und CD40L herauf (für CD28 hier nicht gezeigt) und induzieren die Immunglobulinsynthese durch B-Zellen, wirken also qualitativ gesehen gleich. In den Bereichen geringerer anti-CD3 Ak Konzentration war die Wirkung des ICOS Moleküls zwar immer deutlich schwächer als die des CD28 Moleküls, was sich jedoch durch die, unter diesen Stimulationsbedingungen, geringe Expression des ICOS Moleküls selber erklären läßt.

Wie bereits angesprochen ist auch das induzierte Zytokinmuster nicht ICOS spezifisch; auch andere kostimulatorische Moleküle können ein solches Muster induzieren. Keiner der Befunde bezüglich der Kostimulation konnte also zeigen, daß an einem Punkt des Signalnetzwerks des Immunsystems nur die Stimulation über ICOS zu einem bestimmten Ergebnis führt. Somit zeigen diese Versuche wiederum eine Redundanz in der Funktion kostimulatorischer Moleküle. Sie können daher nicht dazu dienen zu erklären, warum gerade die Expression des ICOS Moleküls für den Organismus notwendig ist.

6.3 Die Blockade des ICOS Moleküls mit dem ICOS spezifischen monoklonalen Antikörper hat keinen Effekt auf die T-Zellinduzierte Immunglobulinsynthese

Viele Untersuchungen der letzten Jahre haben die essentielle Funktion der CD40-CD40L Interaktion für die Induktion der Immunglobulinsynthese und den Immunglobulinklassenwechsel zeigen können *[Lederman, S. et al., 1992, Splawski, J. et al., 1993]*. Einige der diesbezüglich gemachten Untersuchungen zeigen allerdings auch, daß noch andere Moleküle an dieser Regulation beteiligt sein müssen *[Kwekkeboom, J. et al., 1994, MacLennan, I.C.M. et al., 1997, Nishioka, Y. and Lipsky, P.E., 1994]*. Die Befunde der knock-out Mäuse und der Hyper-IgM Patienten zeigen außerdem, daß wenn die CD40/CD40L Interaktionen ausfallen, diese nicht von der Interaktion des CD28 Moleküls übernommen werden können, obwohl dieses ebenfalls eine wichtige Rolle im Keimzentrum spielt *[Banchereau, J. et al., 1994, Kosco-Vilbois, M.H. et al., 1997]*. Aufgrund der daraus entstehenden Notwendigkeit, andere Moleküle zu finden, deren Funktion diese Umstände erklärt und der überaus markanten, umschriebenen ICOS Expression in vivo, wurde untersucht, ob eines dieser anderen Moleküle das ICOS Molekül ist.

Obwohl die Interaktion zwischen T- und B-Zellen in dem benutzten System zweifelsohne zu blockieren war, da die Immunglobulinsynthese durch den anti-CD40 Ak stark unterdrückbar war, lösten die benutzten $F(ab)_2$-Fragmente des anti-ICOS Antikörpers keinen Effekt aus. Da in Vorversuchen

bestätigt wurde, daß die hergestellten $F(ab)_2$-Fragmente spezifisch binden konnten, ist es eher unwahrscheinlich, daß der fehlende Effekt in der fehlenden Bindung des $F(ab)_2$ Fragments an das ICOS Molekül begründet liegt. Möglich ist jedoch, daß der ICOS Ak zwar das ICOS Molekül bindet, jedoch an einem Epitop angreift, dessen Bindung die Interaktion zwischen dem ICOS Molekül und seinem natürlichen Liganden nicht blockiert. Eine andere mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte darin liegen, daß die Interaktion des ICOS Moleküls mit seinem Liganden zwar eine wichtige Funktion im Rahmen der Induktion der Immunglobulinsynthese ausübt, daß aber in dem verwendeten System der Ligand des ICOS Moleküls nicht oder nicht ausreichend induziert wird. Dann wäre die Interaktion zwischen den beiden Molekülen nicht entscheidend an der in diesen Experimenten induzierten Immunglobulinsynthese beteiligt. Möglich ist auch, daß die Funktion des ICOS Moleküls in dem benutzten experimentellen System durch CD28 oder ein anderes Molekül kompensiert werden kann.

Schließlich darf nicht außer acht gelassen werden, daß die ICOS-ICOSL Interaktion möglicherweise keine Rolle für die Induktion der Immunglobulinsekretion darstellt. Zwar ist diese Funktion eine der auffälligsten, die in dem Kompartiment induziert wird, in dem eine starke ICOS Expression zu finden ist, dennoch besteht die Möglichkeit, daß die physiologische Funktion des ICOS Moleküls in anderen Bereichen liegt. Die Helle Zone des Keimzentrums ist zum Beispiel auch dadurch gekennzeichnet, daß hier ein relativ dichtes Netz von FDC vorhanden ist, die wichtige Signale sowohl für T- wie auch für B-Zellen liefern *[Grouard, G. et al., 1995, , Koopman, G. et al., 1994, Kosco-Vilbois, M.H. et al., 1997, Liu, Y. and Arpin, C., 1997, McLennan, I.C.M., 1994]*. Vielleicht exprimieren diese den ICOS Liganden und das ICOS/ICOSL Paar ähnelt somit dem erst kürzlich entdeckten TRANCE/TRANCEL (TNF-related activation-induced cytokine) bzw. RANK/RANKL Paar (Receptor Activator of NF-κB), die wesentlich an der Interaktion von dendritischen Zellen und T-Zellen beteiligt sind *[Anderson, D.M. et al., 1997, Wong, B.R. et al., 1997]*. Diese Möglichkeiten werden in Zukunft durch anders konzipierte Experimente überprüft werden müssen. Neben der genauen Ursache für die Nichtblockierbarkeit werden diese Experimente dann hoffentlich dazu beitragen die Auswirkungen der ICOS ICOSL Interaktion zu klären.

6.4 Die Langzeitstimulation über das ICOS Molekül führt zu einer drastisch reduzierten T-Zellantwort bei Restimulation

Eine Reihe von Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, daß eine Erklärung für die Vielfalt der kostimulatorischen Moleküle darin liegen könnte, daß einige dieser Moleküle die Ansprechbarkeit der Zellen auf eine Restimulation positiv oder negativ verändern können *[Damle, N.K. et al., 1992a, Fischer, H. et al., 1992, Wolf, H. et al., 1994]*. Somit könnte durch aufeinanderfolgende Kostimulation durch unterschiedliche Moleküle, die T-Zellaktivierung und -funktion an verschiedenen Stationen ihrer Aktivierung und Differenzierung kontrolliert und gelenkt werden (z.B. in *Kuiper, H.M. et al., 1995* diskutiert). Zudem scheint eine weitere wichtige Funktion der Kostimulation durch das CD28 Molekül zu sein, daß diese Kostimulation die Anergie verhindern kann, die durch Stimulation via den TZR in Abwesenheit von CD28 vermittelter Kostimulation eintritt. Neben CD28 scheint nur das HSA Molekül (Heat-stable Antigen) von allen bis jetzt bekannten kostimulatorischen Molekülen diesen Effekt vermitteln zu können *[Liu, Y. and Linsley, P.S., 1992]*. Es war somit interessant zu untersuchen, wie

sich eine Prästimulation oder Restimulation mit ICOS Kostimulation auswirkt; ob diese den einen oder anderen der oben angesprochenen Effekte ebenfalls auslösen kann.

Es zeigten sich jedoch eher gegenteilige Effekte: Die Ansprechbarkeit der Zellen auf eine Kostimulation mit CD28, wie dies in *Damle, N.K. et al., 1992a* für andere kostimulatorische Moleküle gezeigt werden konnte, wurde durch eine Prästimulation mit ICOS nicht verbessert. Auch bezüglich der Verhinderung von Anergie zeigte sich ein eher entgegengesetzter Effekt: Wurden die Zellen länger durch das ICOS Molekül stimuliert als die üblicherweise für die Proliferationsmessung veranschlagten drei Tage, so war ihre Antwort auf eine Restimulation via CD3 Molekül deutlich supprimiert. Diese Befunde entsprechen auf den ersten Blick gesehen einer Reihe von Arbeiten, die zeigen, daß die Induktion von Anergie nach einer initialen Stimulation der T-Zellen durch einen Mangel an IL-2 zustande kommt und daß sie durch IL-2 aufgehoben werden kann *[Wolf, H. et al., 1994]*. Die in *Wolf, H. et al., 1994* vorliegenden Bedingungen und Ergebnisse stimmen mit den Experimenten zur Langzeitstimulation über das ICOS Molekül überein. Das ICOS Molekül scheint nicht in der Lage zu sein, signifikante Mengen von IL-2 zu induzieren (5.2.2.2.1), so daß durch Kostimulation via ICOS ein Milieu entsteht, in dem die Induktion von Anergie eintritt. Die Analyse der Zellviabilität vor der Restimulation zeigte jedoch eine andere mögliche Ursachen dieser Depression. Die Viabilität der mit ICOS kostimulierten Zellen lag signifikant niedriger als derjenigen Zellen, die nur mit CD3 Ak oder mit anderen Kostimuli stimuliert worden waren (s. Tabelle in 5.3.2). Durchaus ähnliche Befunde liegen auch für ICAM und VCAM vor, deren Kostimulation bei primären Zellen nach sechs Tagen ebenfalls zu einer Abnahme der Proliferation führt *[Damle, N.K. et al., 1992b]*. Die Kostimulation von Ag sensibilisierten Zellen über ICAM oder VCAM führt, analog zu den Ergebnissen für ICOS (allerdings nicht mit Ag sensibilisierten Zellen), zu einer starken Abnahme der Viabilität *[Damle, N.K. et al., 1993]*. Die in Abb. 18 gezeigte Depression der Zellproliferation scheint also nicht auf einen anergen Zustand zurückzuführen sein, sondern dadurch zu entstehen, daß die durch das ICOS Molekül stimulierten Zellen vermehrt absterben. Schließlich deutet darauf schon der Befund hin, daß die mit dem mAk F44 vorstimulierten Zellen bei einer Restimulation über das CD3 Molekül noch weniger Proliferation zeigen, als die durch zweimalige anti-CD3 Stimulation in ihrer Proliferation deutlich eingeschränkten Zellen (Abb. 18). Die in Abb. 18 und 19 gezeigten Befunde entsprechen letztlich den in *Moskophidis, D. et al., 1993, Radvanyi, L.G. et al., 1993* und *Wesselborg, S. et al.,1993* gezeigten Bedingungen und Befunden, daß nach einer initialen Proliferation Apoptose induziert werden kann. Auffällig ist jedoch der Unterschied, daß das ICOS Molekül, was sich bezüglich aller anderen bis jetzt untersuchten Parameter (Proliferation, Heraufregulation von Aktivierungsantigenen, Zytokinsekretion und T-Zellhilfe) deutlich als kostimulatorisches Molekül darstellte, die in *Wolf, H. et al., 1994* dargestellten Befunde, daß kostimulatorische Agenzien Anergie durchbrechen können, nicht bestätigt. Im Gegenteil: durch das ICOS Molekül wird stärker noch als durch die Anergie verhindert, daß die so stimulierten Zellen auf einen zweiten Stimulus antworten, da sie vermehrt absterben.

Dieses Ereignis tritt allerdings nur bei der Prästimulation mit mAk F44 auf. Wird die Kostimulation durch anti-ICOS Ak bei der Restimulation von Zellen eingesetzt, die über den TZR anergisiert wurden (Abb. 17), so ist das Molekül in der Lage, wie alle anderen eingesetzten kostimulatorischen Agenzien, die Anergie aufzuheben. Ob die beobachtete Proliferationsdepression unter diesen

Stimulationsbedingungen tatsächlich durch Anergie entsteht, muß noch durch Experimente geklärt werden, die diese Fragestellung spezifisch untersuchen. Die Langzeitstimulation über anti-CD3 Ak induziert jedenfalls keine signifikant stärkere Abnahme der Viabilität als bei den Zellen zu verzeichnen ist, die durch andere Kostimuli als ICOS kostimuliert wurden (s. Tabelle in 5.3.2). Und das Ergebnis, daß eine Restimulation via ICOS nach einer initialen anti-CD3 Stimulation, die Proliferationsdepression der Zellen rückgängig machen kann (5.3.1.), ist bezüglich der in 5.3.1.verwendeten Kostimuli identisch mit Versuchen in *Wolf, H. et al., 1994*. Dort wird die durch die kostimulatorischen Stimuli aufhebbare Proliferationsdepression als Verhinderung von Anergie interpretiert.

Es ist wahrscheinlich, daß der Effekt der Prästimulation durch ICOS (5.3.2) abhängig von der Zeitdauer der erfolgten Kostimulation ist, was sich auch im mikroskopischen Aussehen der Zellen widerspiegelte, die erst nach drei bis vier Tagen deutlich an Viabilität verloren. Diese Annahme müßte allerdings noch direkt überprüft werden, indem die über ICOS kostimulierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit anti-CD3 Ak restimuliert werden. Ob es sich bei dem beobachteten Viabilitätsverlust tatsächlich um die Induktion von Apoptose handelt, muß detailliert durch die Untersuchung Apoptose spezifischer Parameter, wie DNA-laddering, untersucht werden. Die mikroskopische Untersuchung der mit mAk F44 kostimulierten Zellen zeigte jedoch neben der Abnahme der Viabilität, "membrane-blebbing" und apoptotische Vesikel (nicht dargestellt), so daß diese Befunde diese Annahme eher stützen. Auch erste Untersuchungen des Zellzyklus der durch ICOS vorstimulierten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die nur über anti-CD3 Ak stimuliert wurden, zeigen Ergebnisse, die nahezu identisch zu denen in *Radvanyi, L.G. et al., 1993* sind, was im Hinblick auf die dort gemachten Aussagen ebenfalls darauf hindeutet, daß durch eine Langzeitstimulation über das ICOS Molekül Apoptose induziert wird. Darüber hinaus sind die Ergebnisse zur Restimulation über ICOS relevant für die von *Wolf,H. et al., 1994* aufgestellte Hypothese zur Verhinderung von Anergie. Wolf et al. postulieren, daß ein kostimulatorisches Molekül, das Anergie verhindern kann, dies unabhängig davon erreicht, ob die Stimulation über das kostimulatorische Molekül in der ersten oder der zweiten Phase der Stimulation erfolgt. Die in 5.3 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß diese Hypothese für das ICOS Molekül im Gegensatz zum CD28 Molekül nicht zutrifft. Nur die Restimulation via ICOS hebt die induzierte „Nichtansprechbarkeit“ auf, die Prästimulation via ICOS verstärkt diesen Zustand eher noch.

Zusammengenommen lassen die beiden Ansätze (5.3.1 und 5.3.2) eher den Schluß zu, daß die längere Vorstimulation und die dadurch induzierten Signalwege darüber entscheiden, welche Richtung eine Zellpopulation einschlägt. Solange die Vorstimulation bei allen Zellpopulationen gleich erfolgte, reagieren die Zellen auf eine zweite Stimulation zwar weniger stark, aber eine Kostimulation bewirkt bei ihnen ausnahmslos eine Steigerung der Proliferation. Die Vorstimulation über die verschiedenen kostimulatorischen Moleküle führt jedoch zu sehr unterschiedlichen Effekten. Auch in *Lynch, D.H. et al., 1995* wird darauf hingewiesen, daß kostimulatorische Moleküle den durch Fas induzierten Zelltod positiv oder negativ beeinflussen können. Während durch die Langzeitprästimulation via anti-CD3 Ak Anergie ausgelöst wird, die durch das ICOS Molekül aufgehoben werden kann (5.3.1), so scheint eine Langzeitprästimulation durch das ICOS Molekül selber, Apoptose auszulösen (5.3.2). Das ICOS Molekül ist also in der Lage, einander entgegengesetzte Effekte zu induzieren. Dies und die oben

beschriebenen Ergebnisse deuten an, daß kostimulatorische Moleküle die Richtung, die eine T-Zelle am Scheideweg zwischen Anergie und Aktivierung einschlägt, unterschiedlich lenken können und zwar abhängig von den gerade herrschenden Bedingungen, bzw. den Bedingungen, die sich nach ihrer Wirkung einstellen.

Die in 5.3.1 und 5.3.2 dargestellten Befunde lassen sich gut mit einer Reihe von Arbeiten vereinbaren, die die Bedingungen der Induktion von Apoptose und Anergie genauer untersucht haben Dabei wird in vielen Arbeiten allerdings nur die meßbare „Nichtansprechbarkeit" der Zellen analysiert, nicht aber, ob dieser ein verstärkter Zelltod zugrunde liegt. Die Differenzierung in „Apoptose" und „Anergie" ist also nicht immer vorhanden. Die gemachten Befunde müssen somit z.T. auf beide Phänomene bezogen werden. Zum einen haben diese Arbeiten gezeigt, daß die Induktion der Apoptose, die in den meisten Arbeiten durch Stimulation und Restimulation über den TZR induziert wird, die Aktivierung der Zellen und einen gewissen Zwischenzeitraum voraussetzt, um über die Ligation des CD95 Moleküls (welches konstitutiv exprimiert wird) durch das CD95L Molekül (welches aktivierungsabhängig induziert werden muß) zum sogenannten „AICD" (einem nur nach Aktivierung der Zellen induzierbaren Zelltod) zu führen *[Alderson, M.R. et al., 1995, Dhein, J. et al., 1995, Ju., S.-T., et al., 1995, Klas, C. et al., 1993]*. Diese aktivierungsabhängige Zelldepression läßt sich auch in vivo nachweisen, wobei Apoptose oder Anergie nicht in allen Fällen durch Ligation von CD28 verhindert werden *[Damle, N.K. et al., 1993, Friccius, H. et al., 1993]*. Die Ursachen dafür, daß die Ligation des T-Zellrezeptors in einigen Fällen zu Anergie oder zum programmierten Zelltod führt, in anderen Situationen jedoch zu einer T-Zellproliferation, sind noch relativ unklar *[Krammer, P.H., 1994]*. Viele Autoren schlagen Modelle vor, die davon ausgehen, daß je nach Stimulation unterschiedliche Stärken der T-Zelldepression induziert werden *[Arnold, B. et al., 1993, Schwartz, R.H., 1990]*. Diese unterschiedliche "Tiefe" der Depression führt u.U. dazu, daß es unter bestimmten Bedingungen möglich ist, die erzeugte Anergie rückgängig zu machen, unter anderen Bedingungen jedoch nicht. Die Reversibilität der Anergie stellt nämlich ein ebenfalls kontrovers diskutiertes Thema dar über das noch keine einheitliche Meinung existiert *[Schwartz, R.H., 1990*], weshalb die obige These, daß die Restimulation via ICOS die erzeugte Anergie durchbrechen kann, keine definitive Erklärung der Ergebnisse darstellen kann. Auch die Rolle der Zytokine, insbesondere von IL-2, aber auch von IL-4 und IFN-γ ist noch nicht abschließend geklärt. Einige Arbeitsgruppen stellen fest, daß Apoptose oder Anergie von bestimmten Zytokinen abhängig ist bzw. nur durch die Zytokine induziert werden können. Andere finden, daß diese Phänomene von Zytokinen unbeeinflußt bleiben. Entsprechend kontrovers wird die Rolle der Zytokine diskutiert *[Boise, L.H. et al., 1995, Boussiotis, V.A. et al., 1996, Damle, N.K. et al., 1993, Essery, G. et al., 1988, Fournel, S. et al., 1996, Liu, Y and Janeway, C.A., 1990, Soares, L.R.B. et al., 1997, Wolf, H. et al., 1994]*. Deshalb eignen sich die hier gemachten Befunde zur Kostimulation via IL-2 wohl auch nur bedingt zum Vergleich mit den Effekten, die durch Kostimulation via das ICOS Molekül ausgelöst wurden. Hinzu kommen auch noch die in 5.3.2 bereits analysierten Unterschiede innerhalb dieser beiden Zellpopulationen. Wie in Tabelle 1 eindrucksvoll zu sehen ist, verhält sich die Viabilität der durch ICOS bzw. IL-2 vorstimulierten Zellen völlig entgegengestzt. Es ist wahrscheinlich, daß die durch Kostimulation via IL-2 induzierte Proliferationsdepression eine andere Grundlage hat als diejenige, die durch ICOS induziert wird. Die Analyse der Kostimulation via IL-2 stellte jedoch nicht das Ziel der Arbeit dar. Somit kann bezüglich

der Rolle der Zytokine hier nur konstatiert werden, daß ihre Anwesenheit nicht alleine festlegen kann, wie sich eine T-Zelle nach ihrer Aktivierung differenziert. Schließlich sollte in der Zellpopulation, die mit CD28 vorstimuliert wurde, IL-2 induziert worden sein. Diese Zellen reagieren auf Restimulation mit anti-CD3 Ak jedoch anders als die Zellen, denen in der Vorstimulationsphase IL-2 hinzugefügt wurde (Abb. 19). Dennoch müßte aufgrund der dargestellten Ergebnisse überprüft werden, ob die Zugabe von IL-2 zu Beginn der Prästimulation über ICOS die Zellviabilität als „extrinsic survival factor" *[Boise, L.H. et al., 1995]* verbessern kann oder ob die durch ICOS induzierten Effekte vollkommen unabhängig von Zytokinen induziert werden. Gegen die völlige Unabhängigkeit von Zytokinen spricht der Befund, daß eine Restimulation mit IL-2 die Proliferationsdepression, die durch ICOS hervorgerufen wird, aufheben kann. Diese Befunde entsprechen denen in *Wolf, H. et al., 1994*. Die Reversibilität der Proliferationsdepression durch IL-2 könnte jedoch auch dahingehend interpretiert werden, daß nicht alle Zellen durch ICOS Kostimulation apoptotisch werden und die überlebenden Zellen durch die Stimulation via IL-2 in der zweiten Stimulationsphase vermehrt zur Proliferation angeregt werden.

In vielen der oben zitierten Arbeiten wurde die Anergie oder Apoptose in T-Zellklonen oder in sogenannten „short-term lines" induziert, denen gemeinsam ist, daß sie eine gewisse Zeit Kontakt mit APCs hatten. In *Damle, N.K. et al., 1993* und *Radvanyi, L.G. et al., 1993* wird dieses Phänomen gezielt analysiert und der Schluß gezogen, daß für die Induktion der Apoptose der Kontakt der T-Zellen mit APC notwendig ist. Dabei ist die Notwendigkeit dieses T-Zell-APC Kontakts für die Induktion der Apoptose via CD95-CD95L Interaktion nicht gegeben, da dieser Signaltransduktionsweg durch benachbarte T-Zellen ausgelöst werden kann *[Dhein, J. et al., 1995]*. Andere Zell-Zellkontaktabhängige Mechanismen scheinen für diesen Effekt verantwortlich zu sein *[Radvanyi, L.G. et al., 1993]*. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse bezüglich des ICOS Moleküls und den oben beschriebenen Charakteristika der Apoptose ist es verlockend davon auszugehen, daß das ICOS Molekül und sein Ligand dieser Kontaktabhängigkeit zugrunde liegen. Dafür sprechen folgende Befunde: Das ICOS Molekül wird nach T-Zellaktivierung induziert. Die, in den hier dargestellten Experimenten, gemachten Befunde zeigen ähnlich wie in *Damle, N.K. et al., 1992b* und *Wesselborg, S. et al., 1993*, daß die Zellen nach (ICOS-) Stimulation zunächst proliferieren, dann aber ihre Viabilität verlieren. Trotz möglicher CD28/B7 Interaktion, (über APC oder über B7 Expression der Nachbar T-Zellen *[Azuma, M. et al., 1993]*) kommt es in einigen der oben zitierten und weiteren Arbeiten (z.B. in *Damle, N.K. et al., 1993*) nicht zur Verhinderung der Apoptose. Einige Arbeiten zeigen außerdem, daß nur eine maximale Stimulation über den TZR die Apoptose induzieren konnte *[Radvanyi, L.G. et al., 1993, Wolf, H. et al., 1994]*, was sich im Hinblick auf ICOS dadurch erklären ließe, daß nur eine starke T-Zellrezeptorstimulation in der Lage ist, die Expression von ICOS so zu induzieren, daß es seine „Apoptose induzierende" Funktion ausüben kann.

Analog zu CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) *[Boussiotis, V.A. et al., 1996, Perez, V.L., 1997, Waterhouse, P. et al., 1996]* und FasL *[Krammer, P.H. et al., 1994, Lynch, D.H. et al., 1995]* könnte das ICOS Molekül somit ein zweites Molekül darstellen, das in der Lage ist, eine entscheidende Rolle in der Regulation der T-Zellimmunantwort zu spielen. T-Zelltoleranz wird durch verschiedene Mechanismen erzeugt: Deletion im Thymus, Anergie und Apoptose in der Peripherie.

Das ICOS Molekül könnte entscheidende Weichen für Anergie oder Apoptose stellen. Folgende Vorgänge könnten dabei entscheidend sein: Eine hohe Dosis von Ag, wie im Falle der Reaktion einer T-Zelle mit Selbst-Ag z.B., könnte unter zur Induktion des ICOS Moleküls führen. Die daran anschließende Ligation des ICOS Moleküls könnte entweder die Dichte der Expression von CD95L induzieren, die für die Apoptoseinduktion notwendig ist (Vorversuche haben gezeigt, daß die Zellen nach einer Prästimulation mit ICOS stark $FasL^+$ werden) oder die T-Zelle für die Interaktion von CD95 mit CD95L empfindlich machen. Oder aber durch das ICOS Molekül wird ein dritter Mechanismus (neben der Fas/FasL Interaktion und dem durch CTLA-4 ausgelösten Signal) induziert, der zum Zelltod führt. Durch diese Interaktion könnte dann diese unerwünschte, autoreaktive Immunreaktion terminiert werden. Auf der anderen Seite würde eine geringe Konzentration von Ag, wie dies eher bei exogenem Ag vorzufinden ist, die CD28/B7 Interaktion bevorzugen, so daß es durch die Induktion von extrinsischen und intrinsischen Überlebensfaktoren *[Boise, L.H. et al., 1995, Bousiotis, V.A. et al., 1995, Noel, P.J. et al., 1996a]* zu einer klonalen Expansion der T-Zellen käme. Für dieses Modell spricht auch, daß IL-2 die Herunterregulation von CD28 verhindern kann *[Friccius, H. et al., 1993]*. Durch Kostimulation via ICOS entstünde also eine Situation, in der die Herunterregulation von CD28 eher begünstigt wäre, da durch Kostimulation via ICOS kein IL-2 induziert wird. Andererseits lassen die gemachten Befunde auch die Möglichkeit zu, daß unter Bedingungen, durch die die Herunterregulation von CD28 verhindert wird, die via ICOS auf Apoptose programmierten Zellen durch die CD28-B7 Interaktion vor der Apoptose geschützt werden. Die in 5.3.3 dargestellten Versuche zeigen, daß eine Restimulation der Zellen, die mit ICOS vorstimuliert wurden, durch CD28, IL-2 oder PMA die Induktion der Apoptose verhindern kann. Die Kostimulation über zunächst ICOS und dann anschließend CD28 kann also dazu führen, daß die T-Zellen zwei aufeinanderfolgende Expansionsstimuli bekommen. Diese doppelte Expansion ist in vivo u.U. nötig, um die anfänglich sehr kleine Ag spezifische T-Zellpopulation so zu expandieren, daß sie überhaupt in der Lage ist, die entscheidenden Schritte der Immunabwehr zu dirigieren. Das Schicksal der aktivierten T Zellen würde also entscheidend durch eine Reihe von Faktoren bestimmt:

1. Über die Konzentration an stimulierendem Ag
2. Über die Expressionsdichte und Affinität der kostimulatorischen Moleküle
3. Über die Dauer der Kostimulation
4. Über den durch vorherige Stimulation induzierten Aktivierungsstatus der T-Zelle.

Die in dieser Diskussion angesprochenen Ergebnisse lassen es möglich erscheinen, daß das ICOS Molekül einerseits zusammen mit CTLA-4 einen Gegenpart zu CD28 übernehmen kann. Andererseits lassen sich einige der Ergebnisse auch dahingehend interpretieren, daß das ICOS Molekül synergistisch mit der CD28 Funktion wirkt. Die genauen Umstände dieser entgegengesetzten Funktionen werden in Zukunft noch determiniert werden müssen.

Die Vielfalt und teilweise Redundanz *[Boriello, F. et al., 1997, Boussiotis, V.A. et al., 1996, Lenschow,*

D.J. et al., 1996] der Interaktionen zwischen den Molekülen in der Ig-Superfamilie läßt es nicht unmöglich erscheinen, daß zusätzlich zu CD28 und CTLA-4 und zu B7-1, -2 und möglicherweise -3 *[Azuma, A. et al., 1993, Boriello, F. et al., 1997, Lenschow, D.H. et al. 1996, Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A., 1993]* ein weiteres Molekül existiert, daß entscheidend an der negativen und der positiven Kontrolle der T-Zellaktivierung beteiligt ist. Dafür sprechen auch die Befunde im Maussystem, die zeigen, daß nicht alle T-Zellfunktionen durch genetische Deletion dieser Faktoren verloren gehen *[Ding, L. et al., 1995, Lane, P. et al., 1994, Lucas, P.J. et al., 1995, Ronchese, F. et al., 1994, Shahinian, A. et al., 1993]*. Die T-Zellaktivierung, insbesondere die Initiation der Aktivierung, scheint in diesen Fällen von anderen kostimulatorischen Molekülen übernommen werden zu können. Die Funktion des CD28 Moleküls scheint v.a. zu einem späteren Zeitpunkt der T-Zellaktivierung essentiell und die frühe T-Zellaktivierung auch ohne CD28 möglich zu sein *[Lane, P. et al., 1994, Lucas, P.J. et al., 1995, Mittrücker, H.-W. et al., 1996, Zhang, Y.-Q. et al., 1997]*. Auch in einigen in vitro Kultursystemen konnte eine CD28 unabhängige kostimulatorische Aktivität demonstriert werden *[Ding, L. and Shevach, E.M., 1996]*. Interessant sind diese Befunde v.a. im Hinblick auf das Vorliegen einer Subpopulation von T-Zellen, die kein CD28 exprimieren. Diese Subpopulation ist auch in gesunden Individuen zu finden. Studien mit diesen Zellen deuten an, daß die Aktivierung dieser Zellen über andere, noch nicht bekannte kostimulatorische Moleküle erfolgen muß *[Behar, B.S.M. et al., 1995]*, wobei sich für diese Funktion das ICOS Molekül anbietet. Medizinisch relevant ist dies insbesondere, da bei einigen Autoimmunerkrankungen diese Population von Zellen stark expandiert ist *[Nafaguchi, H. et al., 1994, Park, W. et al., 1997]*. Dies ist v.a. insofern interessant, da durchflußzytometrische Analysen von Synovialflüssigkeit einiger rheumatoider Arthritispatienten eine ICOS Expression der T-Zellen andeuten, wenn auch weitere Analysen notwendig sein werden, um diese Tatsache befriedigend und statistisch valide zu interpretieren. Auch der starken Expansion von $CD28^-$ Zellen in HIV-Patienten und der verstärkten Induktion von AICD bei diesen Patienten *[Groux, H. et al., 1992, Meeyard, L. et al., 1992, Saukonnen, J.J. et al., 1993]*, die bis jetzt durch das Vorliegen unbekannter kostimulatorischer Moleküle erklärt wurde, könnte eine Expansion durch Kostimulation via ICOS zugrunde liegen. Diese Kostimulation würde analog zu den in 5.3.2 gezeigten Befunden aufgrund des Fehlens von CD28 durch alleinige Wirkung des ICOS Moleküls zu einer Proliferation mit anschließender Apoptose führen.

Momentan ist es therapeutisch nur möglich, die Immunantwort unselektiv zu verstärken oder zu drosseln, was eine Reihe von Problemen mit sich bringt, wie z.B. die erhöhte Infektionsgefahr von Patienten, die aufgrund von Transplantationen oder Autoimmunerkrankungen immunsupprimiert werden müssen. Es besteht große Hoffnung, daß es durch die Manipulation der Kostimulation in Zukunft möglich sein wird, die Immunantwort selektiv zu beeinflussen. Dadurch wäre es z.B. möglich eine gezielte Verstärkung der Immunantwort gegenüber Tumoren , bzw. eine spezifische Toleranz gegenüber Transplantaten zu erreichen. Diese Ansätze werden für einige kostimulatorische Moleküle bereits durch in vivo Studien untersucht *[Boussiotis, V.A. et al., 1994, Judge, T. et al., 1996, Lane, P., 1995, Melero, I. et al, 1997, Tivol, E.A. et al., 1996]*. Träfe die oben vorgestellte These zur Funktion des ICOS Moleküls zu, so wäre mit der Entdeckung des ICOS Moleküls ein weiteres Molekül gefunden, dessen Manipulation potentiell eine große Rolle bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Transplantationen und Neoplasien spielen könnte.

Letztlich darf allerdings auch nicht außer acht gelassen werden, daß die hier gemachten Befunde eine artifizielle in vitro Situation darstellen. Sie lassen nur sehr bedingt Rückschlüsse auf die in vivo ablaufenden Interaktionen zu. Nur gezielte Modulationen der Expression des ICOS Moleküls in in vivo Modellen werden analysieren können, inwiefern die hier gemachten Befunde den Effekten der ICOS Funktion in vivo entsprechen. Dort stellt das ICOS Molekül einen winzigen Teilbestandteil eines komplexen Netzwerks von löslichen und membranständigen Molekülen dar, deren Funktion wesentlich von Interaktionen zwischen den verschiedenen Bestandteilen abhängt, so daß die isolierte Betrachtung des ICOS Moleküls u.U. zu Ergebnissen führt, wie sie in vivo gar nicht entstehen können.

Auf jeden Fall deuten die in vitro gemachtenBefunde einige grundlegende Funktionen des ICOS Moleküls an: Das ICOS Molekül funktioniert nicht nur als aktivierendes Molekül, sondern scheint auch eine abschaltende Funktion zu besitzen. Jede Immunantwort in vivo muß nach einem gewissen Zeitraum beendet werden, da die permanente Aktivierung des Immunsystems für den Organismus letal ist. Dies konnte eindrucksvoll durch die CTLA-4 knock-out Mäuse gezeigt werden. Bei diesen Mäusen führt der Ausfall des abschaltenden Moleküls CTLA-4 innerhalb weniger Wochen zum Tod der Tiere *[Waterhouse, P. et al., 1996]*. Auch das ICOS Molekül scheint eine wichtige Abschaltfunktion induzieren zu können. Wenngleich dieser Befund in vitro gemacht wurde, ist davon auszugehen, daß das ICOS Molekül durch diese Eigenschaft ein für das Überleben des Organismus essentielles Molekül darstellt. Weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der exakten Funktion des ICOS Moleküls werden dazu beitragen das Immunsystem noch besser zu verstehen und auf der Basis dieses Verständnisses therapeutische Eingriffe durchführen zu können.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsschrift enthält eine detaillierte Beschreibung der Induktionsbedingungen des ICOS Moleküls und eine ausführliche Darstellung der ICOS Funktionen. Die Experimente, die zur Induktion des ICOS Moleküls durchgeführt wurden, zeigen, daß die Expression des ICOS Moleküls sehr schnell nach T-Zellaktivierung induziert wird (nach 4h Stimulation mit PMA und Ionomycin sind bereits 68% aller Zellen $ICOS^+$) und daß das Molekül mindestens 96h auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Durch Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern oder PHA P läßt sich die Expression des ICOS Moleküls ebenfalls induzieren, die Kinetik der Expression ist allerdings deutlich langsamer. Die Expression des ICOS Moleküls wird früher als die Expression von CD25 hochreguliert. Sie verläuft etwa zeitgleich zur Hochregulation der CD40L Expression, sofern die Stimulation via PMA und Ionomycin erfolgt. Außerdem zeigt die Stimulation mit PMA oder Ionomycin alleine, ebenso wie die Expression des ICOS Moleküls nach CsA Zusatz, daß die Induktion des Moleküls zweisignalabhängig ist.

Bezüglich der Funktion von ICOS wurde die Wirkung der Kostimulation via ICOS auf eine Reihe von kritischen Parametern der T-Zellaktivierung analysiert. Dabei zeigte sich, daß die Kostimulation via ICOS positive Wirkungen auf die T-Zellaktivierung hat. Durch die Kostimulation via ICOS wird die T-Zellproliferation induziert, abhängig von der Konzentration des kostimulatorischen Antikörpers F44. Die ICOS Kostimulation bewirkt die Hochregulation von CD40L um den Faktor 5. Die Expression des IL-2 Rezeptors CD25 wird verdoppelt. Die Kostimulation durch ICOS induziert die Sekretion von IL-4 bzw. reguliert die Sekretion von IL-5, IFN-γ und ATAC herauf. Die verstärkende Wirkung auf alle diese Parameter der T-Zellaktivierung führt schließlich dazu, daß die über ICOS kostimulierten Zellen in der Lage sind T-Zellhilfe für B-Zellen zu leisten, so daß diese Immunglobuline sezernieren.

Die kostimulatorische Wirkung des ICOS Moleküls ist nicht an die Stimulation über das CD3 Molekül als erstem Signal gebunden, sondern läßt sich auch mit PHA P als erstem Signal darstellen.

Wurde versucht, die direkte Interaktion des ICOS Moleküls mit seinem potentiellen Liganden bei der T-Zellinduzierten Immunglobulinsekretion durch den mAk F44 zu blockieren, so zeigte sich kein Effekt.

Bei Langzeitkostimulation via ICOS zeigte sich allerdings, daß die Kostimulation durch das ICOS Molekül auch in der Lage ist, die T-Zellaktivierung negativ zu beeinflussen: Die Langzeitstimulation via ICOS erzeugt eine deutliche Proliferationsdepression und einen Viabilitätsverlust der T-Zellen.

Insgesamt lassen diese Funktionen den vorsichtigen Schluß zu, daß das ICOS Molekül eine wichtige Rolle an der Schnittstelle zwischen Expansion und Effektorfunktion einerseits und Depression der T-Zellen andererseits spielt.

8 Literaturverzeichnis

Alberola-Ila, J., Places, L., Cantrell, D.A., Vives, J. and Lozano, F. 1992. Intracellular Events Involved in CD5-Induced Human T Cell Activation and Proliferation. J. Immunol. *148*:1287-1293

Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F. and Lynch, D.H. 1995. Fas Ligand Mediates Activation-induced Cell Death in Human T Lymphocytes. J. Exp. Med. *181*:71-77

Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D. and Galibert, L. 1997. A homologue of the TNF receptor and ist ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature *390*:175-179

Arnold, B., Schönrich, G. and Hämmerling, G.J. 1993. Multiple levels of peripheral tolerance. Immunol. Today. *14*:12-14

Arpin, C., Déchanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Brière, F., Banchereau, J., Liu, Y.-J. 1995. Generation of Memory B Cells and Plasma Cells in Vitro. Science *268*:720-722

Aversa, G., Chang, C-C.J., Carballido, J.M:, Cocks, B.G. and de Vries, J.E. 1997. Engagement of the Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) on Activated T Cells Results in IL-2-Independent Cyclosporin-A-Sensitive T Cell Proliferation and IFN-gamma Production. J. Immunol. *158*:4036-4044

Azuma, M., Yssel, H., Phillips, J.H., Spits, H. and Lanier, L.L. 1993. Functional Expression of B7/BB1 on Activated T Lymphocytes. J. Exp. Med. *177*:845-850

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brière, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Roussel, F., Saeland, S. 1994. The CD40 Antigen and Its Ligand. Ann. Rev. Immunol. *12*:881-922

Baroja, M.L., Lorre, K., Van Vaeck, F. and Ceuppens, J.L. 1989. The Anti-T Cell Monoclonal antibody 9.3 (Anti-CD28) Provides a Helper Signal and Bypasses the Need for Accessory Cells in T Cell Activation with Immobilized Anti-CD3 and Mitogens. Cell. Immunol. *120*:205-217

Behar, B.S.M., Porcelli, S.A., Beckman, E.M. and Brenner, M.B. 1995. A Pathway of Costimulation That Prevents Anergy in CD28- T Cells: B7-Independent Costimulation of CD1-restricted T Cells. J. Exp. Med. *182*:2007-2018

Bich-Thuy, L.T. 1990. High-Affinity Receptors for Interleukin-2 Are Not Required for the Induction of Human Unstimulated B Lymphocyte Differentiation by This Lymphokine. Cell. Immunol.

128:22-30

Boise, L.H., Noel, P.J. and Thompson, C.B. 1995. CD28 and apoptosis. Curr. Op. Immunol. *7*:620-625

Boriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J. and Sharpe, A.H. 1997. B7-1 and B7-2 Have Overlapping, Critical Roles in Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. Immunity *6*:303-313

Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Gribben, J.G. and Nadler, L.M. 1996. The Role of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 Pathways in the Prevention of Anergy, Induction of Productive Immunity and Down-Regulation of the Immune Response. Immunol. Rev. *153*:*5-25*

Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Gribben, J.G. Nadler, L.M. 1995. The critical role of CD28 signalling in the prevention of human T-cell anergy. Res. Immunol. *146*:140-149

Boussiotis, V.A., Gribben, J.G., Freeman, G.J, Nadler, L.M. 1994. Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. Curr. Op. in Immunol. *6*:707-807

Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Invest. Suppl. *21*:977-997

Cebrián, M., Yagüe, E., Rincón, M., López-Botet, M., De Landázuri, M.O. and Sánchenz-Madrid, F. 1988. Triggering of T Cell Proliferation Through AIM, an Activation Inducer Molecule Expressed on Activated Human Lymphocytes. J. Exp. Med. *168*:1621-1637

Clark, E.A. and Lane, P.J. 1991. Regulation of Human B-Cell Activation and Adhesion. Ann. Rev. Immunol. *9*:97-127

Clark, E.A. and Ledbetter, J.A. 1994. How B and T cells talk to each other. Nature *367*:425-428

Cocks, B.G., Chang, C.-C.J., Caballido, J.M., Yssel, H., de Vries, J.E. and Aversa, G. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. Nature *376*:260-263

Corry, D.B., Reiner, S.L., Linsley, P.S. and Locksley, R.M. 1994. Differential Effects of Blockade of CD28-B7 on the Development of Th1 or Th2 Effector Cells in Experimental Leishmaniasis. J. Immunol. *153*:4142-4148

Damle, N.K. and Aruffo, A. 1991. Vascular cell adhesion molecule-1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+ T lymphocytes. Proc. natl. Acad. Sci. USA *88*:6403-6407

Damle, N.K., Klussman, K., Linsley, P.S., Aruffo, A. and Ledbetter, J.A. 1992a. Differential Regulatory Effects of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Costimulation by the CD28 Counter-Receptor B7. J. Immunol. *149*:2541-2548

Damle, N.K., Klussmann, K., Leytze, G., Aruffo, A., Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A. 1993.

Costimulation with Integrin Ligands Intercellular Adhesion Molecule-1 or Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Augments Activation-Induced Death of Antigen-Specific CD4+ T Lymphocytes. J. Immunol. *151*:2368-2379

Damle, N.K., Klussmann, K., Linsley, P.S. and Aruffo, A. 1992b. Differential Costimulatory Effects of Adhesion Molecules B7; ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on Resting and Antigen-primed CD4+ T Lymphocytes. J. Immunol. *148*:1985-1992

Damle, N.K., Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A. 1991. Direct helper T cell-induced B cell differentiation involves interaction between T cell antigen CD28 and B cell activation antigen B7. Eur. J. Immunol. *21*:1277-1282

Dang, N.H., Torimoto, Y., Deusch, K., Schlossman, S.F. and Morimoto, C. 1990. Comitogenic Effect of solid-Phase Immobilized Anti-1F7 on Human CD4 T Cell Activation via CD3 and CD2 Pathways. J. Immunol. *144*:4092-4100

De Boer, M. Kasran, A., Kwekkeboom, J., Walter, H., Vandenberghe, P. and Ceuppens, J.L. 1993. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. Eur. J. Immunol. *23*:3120-3125

Del Prete, G., De Carli, M. , D´Elios, M.M., Daniel, K.C., Almerigogna, F., Alderson, M., Smith, C.A., Thomas, E. and Romagnani, S. 1995. CD30-mediated Signaling promotes the Development of Human T Helper Type 2-like T Cells. J. Exp. Med. *182*:1655-1661

Dhein, J., Walczak, H., Bäumler, C., Debatin, K.-H. and Krammer, P.H. 1995. Autocrine T cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature *373*:438-440

Ding, L. and Shevach E.M. 1996. Activated B Cells Express CD28/B7-Independent Costimulatory Activity. J. Immunol. *157*:1389-1396

Ding. L., Green, J.M., Thompson, C.B. and Shevach, E.M. 1995. B7/CD28-Dependent and -Independent Induction of CD40 Ligand Expression. J. Immunol. *155*:5124-5132

Eisen, S.A., Wednes, H.J. and Parker, C.W. 1972. Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. Immunol. Commun. *1*:571-577

Essery, G., Feldmann, M. and Lamb, J.R. 1988. Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. Immunology. *64*:413-417

Fischer, H., Gjörloff, A., Hedlund, G., Hedman, H., Lundgren, E., Kalland, T., Sjögren, H.O. and Dohlsten, M., 1992. Stimulation of Human Naive and Memory T Helper Cells with Bacterial Superantigen. Naive CD4+CD45RA+ Require a Costimulatory Signal Mediated through the LFA-1/ICAM-1 Pathway. J. Immunol. *148*:1993-1998

Fleisher, T.A. and Marti, G.E. 1992 Detection of unseparated human lymphocytes by flow cytometry. In: Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and

Strober, W. (Hrsg.): Current protocols in immunology. Wiley Interscience Verlag, 7.9.1.-7.9.7.

Fournel, S., Genestier, L., Robinet, E., Flacher, M. and Revillar, J.-P. 1996. Human T Cells Require IL-2 but Not G1/S Transition to Acquire Susceptibility to Fas-Mediated Apoptosis. J. Immunol. *157*:4309-4315

Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Anumanthan, A., Berstein, G.M., Ke, X.-Y., Rennert, P.D., Gray, G.S., Gribben, J.G. and Nadler, L.M. 1995. B7-1 and B7-2 Do Not Deliver Identical costimulatory Signals, since B7-2 but Not B7-1 Preferentially Costimulates the Initial Production of IL-4. Immunity *2*:523-532

Friccius, H., Siegels-Hübenthal, P., Rehbein, A., Schlotz, E. and Pawelec, G. 1993. Induction of Hyporesponsiveness in Human Lymphocytes-T Despite Their Expression of both the Co-receptor CD28 and Its Ligand B7. Cell. Immunol. *151*:283-290

Garonne, P., Neidhardt. E.-M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C. and Banchereau, J. 1995. Fas Ligation Induces Apoptosis of CD40-activated Human B Lymphocytes. J. Exp. Med. *182*:1265-1273

Graf, D., Müller, S., Korthäuer, U., van Kotten, C., Weise, C. and Kroczek, R.A. 1995. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. Eur. J. Immunol. *25*:1749-1754

Gray, D., Siepmann, K., Van Essen, D., Poudrier, J., Wykes, M., Jainandunsing, S., Bergthorsdottir, S. and Dullforce, P. 1996. B-T Lymphocyte Interactions in the Generation and Survival of Memory Cells. Immunol. Rev. *150*:45-61

Grouard, G., De Bouteiller, O., Barthelemy, C., Lebecque, S., Banchereau, J. and Liu, Y.-J. 1995. Regulation of Human B Cell Activation by Follicular Dendritic Cell and T Cell Signals. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *201*:105-117

Groux, H., Torpier, G., Monté, D., Mouton, Y., Capron, A. and Ameisen, J.C. 1992. Activation-induced Death by Apoptosis in CD4+ T Cells from Human Immunodeficiency Virus-infected Asymptomatic Individuals. J. Exp. Med. *175*:331-340

Hirohata, S. and Shinohara, S. 1993. Bidirectional Modulation of Human B Cell Stimulation by Activated T Cells. Cell. Immunol. *150*:257-268

Ho., N., Gullberg. M. and Chatila, T. 1996. Activation Protein1-Dependent Transcriptional Activation of Interleukin 2 Gene by Ca2+/Calmodulin Kinase Type IV/Gr. J. Exp. Med. *184*:101-112

Holter, W., Majdic, O., Liszka, K., Stockinger, H. and Knapp, W. 1985. Kinetics of Activation Antigen Expression in Vitro-Stimulated Human T Lymphocytes. Cell. Immunol. *90*:322-330

Jelinek, D.F., Splawski, J.B. and Lipsky, P.E. 1986. The roles of interleukin 2 and interferon-

gamma in human B cell activation, growth and differentiation. Eur. J. Immunol. *16*:925-932

Jenkins, M.K. 1994. The Ups and Downs of T Cell Costimulation. Immunity *1*:443-446

Ju, S.-T., Panka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., El-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z. and Marshak-Rothstein, A. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature *373*:444-448

Judge, T., Tang, A., Turka, L.A. 1996. Immunosuppression through Blockade of CD28:B7-Mediated Costimulatory Signals. Immunol. Res. *15*:38-49

Kelsoe, G. 1996. Life and Death in Germinal Centers. Immunity *4*:107-111

King, C.L., Stupi, R.J., Craighead, N., June, C.H. and Typhronitis, G. 1995. CD28 activation promotes Th2 subset differentiation by human CD4+ cells. Eur. J. Immunol. *25*:587-595

Klas, C., Debatin, K.-M., Jonker, R.R. and Krammer, P.H. 1993. Activation interferes with the Apo-1 pathway in mature human T cells. Int. Immunol. *5*:625-630

Klaus, S.J., Pinchuk, L.M., Ochs, H.D., Law, C.-L., Fanslow, W.C., Armitage, R.J. and Clark, E.A. 1994. Costimulation Through CD28 Enhances T Cell-Dependent B Cell Activation Via CD40-CD40L Interaction. J. Immunol. *152*:5643-5652

Kobata, T., Agematsu, K., Kameoka, J., Schlossman, S.F. and Morimoto, C. 1994. CD27 Is a Signal-Transducing Molecule Involved in CD45RA+ Naive T Cell Costimulation. J. Immunol. *153*:5422-5432

Koopman, G., Keehnen, R.M.J., Lindhout, E., Newman, W., Shimizu, Y., van Seventer, G.A., de Groot, C. and Pals, S.T. 1994. Adhesion Through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) Pathways Prevents Apoptosis of Germinal Center B Cells. J. Immunol. *152*:3760-3767

Kosco-Vilbois, M.H., Bonnefoy, J.-Y.and Chvatchko, Y. 1997. The physiology of murine germinal center reactions. Immunol. Rev. *156*:127-136

Krammer, P.H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J. and Debatin, K.-M. 1994. Regulation of apoptosis in the immune system. Curr. Op. Immunol. *6*:279-289

Kruisbeek, A.M. and Shevach, E. 1991. Proliferative assays for T-cell function. In: Colilgan, J.E., Kruisbeek, D.H., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W. (Hrsg.): Current protocols in immunology. Wiley Interscience Verlag, 3.12.1.-3.12.14

Kuiper, H.M., Lens, S.M.A., Hintzen, R.Q. and van Lier, R.A.W. 1995. Lymphocyte costimulation: multiple pathways, multiple functions? Res. Immunol. *146*:180-183

Kwekkeboom, J., de Rijk, D., Kasran, A., Barcy, S., de Groot C. and de Boer, M. 1994. Helper effector function of human T cells stimulated by anti-CD3 mAb can be enhanced by co-stimulatory signals and is partially dependent on CD40-CD40L interaction. Eur. J.

Immunol. *24*:508-517

Lagresle, C., Bella, C. Daniel, P.T., Krammer, P.H. and Defrance, T. 1995. Regulation of Germinal Center B Cell Differentiation. J. Immunol. *154*:5746-5756

Lane, P. 1997. Regulation of T and B Cell Responses by Modulating Interactions between CD28/CTLA4 and Their Ligand, CD80 and CD86. Annals N.Y. Acad. Sci. *815*:392-400

Lane, P. 1995 Blocking CD28/B7 with soluble competitors: immunological phenotype of mCTLA-4Hgamma1 transgenic mice. Res. Immunol. *146*:176-179

Lane, P., Burdet, C., Hubele, S., Scheidegger, D., Müller, U., McConnell, F. and Kosco-Vilbois, M. 1994. B Cell Function in Mice Transgenic for mCTLA4-Hgamma1: Lack of Germinal Centers Correlated with Poor Affinity maturation and Class Switching Despite Normal Priming of CD4+ T Cells. J. Exp. Med. *179*:819-830

Lederman, S., Yellin, M.J., Cleary, A.M., Pernis, A., Inghirami, G., Cohn, L, Covey, L., Lee, J.J., Rothman, P. and Chess, L. 1994. T-BAM/CD40-L on Helper T Lymphocytes Augments Lymphokine-Induced B Cell Ig Isotype Switch Recombination and Rescues B Cells from Programmed Cell Death. J. Immunol. *152*:2163-2171

Lederman, S., Yellin, M.J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J.J. and Chess L. 1992. Identification of a Novel Surface Protein on Activated CD4+ T Cells that Induces Contact-dependent B Cell Differentiation (Help). J. Exp. Med. *175*:1091-1101

Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. 1996. CD28/B7 System of T Cell Costimulation. Ann. Rev. Immunol. *14*:233-258

Levine, B.L., Ueda, Y., Craighead, N., Huang, M.L. and June, C.H. 1995. CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. Int. Immunol. *7*:891-904

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K. and Ledbetter, J.A. 1991. CTLA-4 Is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7. J. Exp. Med. *174*:561-569

Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A. 1993. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Ann. Rev. Immunol. *11*:192-212

Lipsky, P.E. 1990. The Induction of Human B-Cell Activation, Proliferation and Differentiation by Anti-CD3-Stimulated T Cells-A Model of T Cell/B Cell Collaboration. Res. in Immunol. *141*:424-427

Liu, Y. and Janeway, C.A. 1992. Cells that can present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4+ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*:3845-3849

Liu, Y. and Janeway, C.A. 1990. IFN-gamma plays a critical role in induced cell death of effector

T cells: a possible third mechanism of self-tolerance. J. Exp. Med. *172*:1735-1739

Liu, Y. and Linsley, P.S. 1992. Costimulation of T-cell growth. Curr. Op. Immunol. *4*:265-270

Liu, Y.-J. and Arpin, C. 1997. Germinal center development. Immunol. Rev. *156*:111-126

Liu, Y.-J., Joshua, D.E., Williams, G.T., Smith, G.T., Gordon, J. and MacLennan, I.C.M. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. Nature. *342*:929-931

López-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernández-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sánchez-Mateos, P. and Sánchez-Madrid, F. 1993. Molecular Cloning, Expression, and Chromosomal Localization of the Human Earliest Lymphocyte Activation Antigen AIM/CD69, a New Member of the C-Type Lectin superfamily of Signal-transmitting Receptors. J. Exp. Med. *178*:537-547

Lynch, D.H., Ramsdell, F. and Alderson, M.A. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol. Today. *16*:569-574

Lucas, P.J., Negishi, I., Nakayama, K.-I., Fields, L.E. and Loh, D.Y. 1995. Naive CD28-Deficient T Cells Can Initiate but Not Sustain an In Vitro Antigen-Specific Immune Response. J. Immunol. *154*:5757-5768

MacLennan, I.C.M. 1994. Germinal Centers. Ann. Rev. Immunol. *12*:117-139

MacLennan, I.C.M., Gulbranson-Judge, A., Toellner, K.-M., Casamayor-Palleja, M., Chan, E., Sze, D.M.-Y., Luther, S.A., Orbea, H.A. 1997. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. Immunol. Rev. *156*:53-66

Manyonada, I.T., Soltys, A.J. and Hay, F.C. 1992. A critical evaluation of the magnetic cell sorter and ist use in the positive and negative selection of CD45RO cells. J. Immunol. Methods. *149*:1-10

Melamed, M.R., Lindmo, T. and Mendelsohn, M.L. 1990. Flow cytometry and sorting. 2nd Ed. Wiley-Liss., Inc., New York

Melero, I. Shuford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellström, K.E., Mittler, R.S. and Chen, L. 1997. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. Nature Medicine *3*:682-685

Meyaard, L., Otto, S.A., Jonker, R.R., Mijnster, M.J., Keet, R.P.M. and Miedema, F. 1992. Programmed Death of T Cells in HIV-1 Infection. Science. *257*:217-219

Mittrücker, H.-W., Shahinian, A., Bouchard, D., Kündig, T.M. and Mak, T.W. 1996. Induction of Unresponsiveness and Impaired T cell Expansion by Staphylococcal Enterotoxin B in CD28-deficient Mice. J. Exp. Med. *183*:2481-2488

Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H.-P. and Zinkernagel, R.M. 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector cells.

Nature. *362*:758-761

Müller, D.L., Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H. 1989. Clonal Expansion Versus Functional Clonal Inactivation: A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancy. Ann. Rev. Immunol. *7*:445-480

Müller, S., Dorner, B., Korthäuer, U., Mages, H.W., D´Apuzzo, M., Senger, G. and Kroczek, R.A. 1995. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule, exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. Eur. J. Immunol. *25*:1744-1748

Nafaguchi, H., Suzuki, N., Mizushima, Y. and Sakane, T. 1994. CD28- expansions in SLE. Arthritis & Rheum. *37*:377. (Abstr.)

Nishioka, Y. and Lipsky, P.E. 1994. The Role of CD40-CD40 Ligand Interaction in Human T Cell-B Cell Collaboration. J. Immunol. *153*:1027-1036

Noel, P.J., Boise, L.H. and Thompson, C.B. Regulation of T Cell Activation By CD28 and CTLA4 in: Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation VI, Plenum Press, New York, 1996a, 209-217

Noel, P.J., Boise, L.H., Green, J.M. and Thompson, C.B. 1996b. CD28 Costimulation Prevents Cell Death During Primary T Cell Activation. J. Immunol. *157*:636-642

Oxenius, A., Campbell, K.A., Maliszewski, C.R., Kishimoto, T. Kikutani, H., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. and Bachmann, M.F. 1996. CD40-CD40 Ligand Interactions Are Critical in T-B Cooperation but Not for Other Anti-viral CD4+ T Cell Functions. J. Exp. Med. *183*:2209-2218

Parham, P. 1983. On the Fragmentation of Monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b From BALB/c Mice. J. Immunol. *131*:2895-2902

Palmer, E.M. and van Seventer, G.A. 1997. Human T Helper Cell Differentiation Is Regulated by the Combined Action of Cytokines and Accessory Cell-Dependent Costimulatory Signals. J. Immunol. *158*:2654-2662

Park, W., Weyand, C.M., Schmidt, D., Goronzy, J.J. 1997. Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+CD28- T cells. Eur. J. Immunol. *27*:1082-1090

Parker, D.C. 1993. T Cell-Dependent B Cell Activation. Ann. Rev. Immunol. *11*:331-360

Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B. and Abbas, A.K. 1997. Induction of Peripheral T Cell Tolerance in Vivo Requires CTLA-4 Engagement. Immunity. *6*:411-417

Porstmann, T. and Kiesing, S.T. 1992. Enzymimmunoassay techniques: An overview. In: Friemel, H. (Hrsg.): Immunologische Arbeitsmethoden. Gustav Fischer Verlag, Jena. 2.6. 135-188

Radvanyi, L.G., Mills, G.B. and Miller, R.G. 1993. Religation of the T cell Receptor after Primary Activation of Mature T Cells Inhibits Proliferation and Induces Apoptotic Cell Death. J Immunol. *150*:5704-5715

Ronchese, F., Hausmann, B., Hubele, S. and Lane, P. 1994. Mice Transgenic for a Soluble Form of Murine CTLA-4 Show Enhanced Expansion of Antigen-specific CD4+ T Cells and Defective Antibody Production In Vivo. J. Exp. Med. *179*:809-817

Sansom, D.M., Wilson, A., Boshell, M., Lewis, J. and Hall, N.D. 1993. B7/CD28 but not LFA-3/CD2 interactions can provide „third-party“ co-stimulation for human T-cell activation. Immunology *80*:242-247

Saukonnen, J.J., Kornfeld, H. and Berman, J.S. 1993. Expansion of CD8+CD28- cell population in the blood and lung of HIV-positive patients. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *6*:1194-1204

Schattner, E.J., Elkon, K.B., Yoo, d.-H., Tumang, J., Krammer, P.H., Crow, M.K. and Friedman, S.M. 1995. CD40 Ligation Induces Apo-1/Fas Expression on Human B Lymphocytes and Facilitates Apoptosis through the Apo-1/Fas Pathway. J. Exp. Med. *182*:1557-1565

Schwartz, R.H. 1996. Models of T Cell Anergy: Is There A Common Molecular Mechanism?. J. Exp. Med. *184*:1-8

Schwartz, R.H. 1990. A Cell Culture Model for T Lymphocyte Clonal Anergy. Science *248*:1349-1356

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P. Kündig, T.M., Kishihara, K. Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B. and Mak, T.W. 1993. Differential T Cell Costimulatory Requirements in CD28-Deficient Mice. Science *261*:609-612

Shanafelt, M.-C., Soderberg, C., Allsup, A., Adelman, D., Peltz, G. and Lahesmaa, R. 1995. Costimulatory signals Can Selectively Modulate Cytokine Production by Subsets of CD4+ T Cells. J. Immunol. *154*:1684-1690

Sideras, P., Noma, T. and Honio, T. 1988. Structure and Function of Interleukin 4 and 5. Immunol. Rev. *102*:189-212

Soares, L.R.B., Rivas, A., Tsavaler, L. and Engleman, E.G. 1997. Ligation of the V7 Molecule on T Cells Blocks Anergy Induction Through a CD28-Independent Mechanism. J Immunol. *159*:1115-1124

Splawski, J., Fu, S.M. and Lipsky, P.E. 1993. Immunoregulatory Role of CD40 in Human B Cell Differentiation. J. Immunol. *150*:1276-1285

Splawski, J. and Lipsky, P.E. 1991. Isolation of B cell populations. In: Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W. (Hrsg.): Current protocols in immunology. Wiley Interscience Verlag., 7.5.1.-7.5.7.

Stüber, E. and Strober, W. 1996. The T Cell-B cell Interaction via OX40-OX40L Is Necessary for the T Cell-dependent Humoral Immune Response. J. Exp. Med. *183*:979-989

Sunder-Plassman, R., Pichl, W.F., Majdic, O., Ruapp, W. and Holter, W. 1995. Crosslinking of CD27 in the Presence of CD28 Costimulation Results in T Cell Proliferation and Cytokine Secretion. Cell. Immunol. *164*:20-27

Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M. and June, C.H. 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines / cytokines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*:1333-1337

Tivol, E.A., Schweiter, A.N. and Sharpe, A.H., 1996. Costimulation and autoimmunity. Curr. Op. Immunol. *8*:822-830

Van Gool, E.A., Vandenberghe, P., de Boer, M. and Ceuppens, J.L. 1996. CD80, CD86 and CD40 Provide Accessory Signals in a Multiple-Step T-Cell Activation Model. Immunol. Rev. *155*:49-83

Van Seventer, G., Shimizu, Y., Horgan, K.J. and Shaw, S. 1990. The LFA-1 Ligand ICAM-1 Provides an Important Costimulatory Signal for T Cell Receptor-Mediated Activation of Resting T Cells. J. Immunol. *144*:4579-4586

Waterhouse, P., Marengère, L.E.M., Mittrücker, H.-W., and Mak, T.W. 1996. CTLA-4, a Negative Regulator of t-Lymphocyte Activation. Immunol. Rev. *153*:183-205

Wesselborg, S., Janssen, O und Kabelitz, D. 1993. Induction of Activation-Driven Death (Apoptosis) in Activated but Not Resting Peripheral Blood T Cells. J. Immunol. *150*:4338-4354

Weiss, A.. T Lymphocyte Activation. In: Paul, W.E., (Hrsg.) Fundamental Immunology, 3rd Ed., Raven Press, 1993, New York, 467-504

Wolf, H., Müller, Y., Salmen, S., Wilmanns, W. and Jung, G. 1994. Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies. Eur. J. Immunol. *24*:1410-1417

Wong, B.R.; Rho, J. Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett III, F.S, Frankel, W.N., Lee, S.Y. and Choi, Y. 1997. TRANCE Is a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Receptor Family That Activates c-Jun N-terminal Kinase in T Cells. J. Bio. Chem. *272*:25190-25194

Zhang, Y.-Q., Joost van Nerven, R.J., Van Grool, S.W., Coorevits, L, de Boer, M. and Ceuppens, J.L. 1997. B7-CD28 interaction is a late acting co-stimulatory signal for human T cell responses. Int. Immunol. *9*:1095-1102

9 Lebenslauf

29.09.1973	Geburt in Göttingen als erstes Kind von Juliane Jacobi und Eckhard Dittrich.
August 1979	Einschulung.
August 1989 bis Juli 1990	Einjähriger Aufenthalt in einer amerikanischen Gastfamilie im Rahmen des Youth for Understanding International Exchange Programms.
1993	Erhalt des Abiturs.
Oktober 1993 bis Juni1994	Aufenthalts im Kibbutz Palmahim, Israel.
August und September 1994	Pflegepraktikum in Bethel, Bielefeld.
Oktober 1994	Beginn des Medizinstudiums an der Humboldt Universität zu Berlin.
September 1994	Erhalt des Physikums
September 1996	Beginn der Arbeit im Labor der Arbeitsgruppe "Molekulare Immunologie" des Robert Koch Instituts, Berlin.
September 1997	Beendigung des experimentellen Teils der Doktorarbeit.
März 1998	Famulatur im Institut für Pathologie, Klinikum der Philipps-Universität, Marburg.
Sommer 1998	Schriftliche Ausarbeitung der Doktorarbeit.
Juli/August 1998	Famulatur in der Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire, Lausanne, Schweiz.
August 1998	Erhalt des 1. Staatsexamens.
September 1998	Famulatur in der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Humaine Klinikum, Frauenklinik, Bad-Saarow-Pieskow.
Oktober 1998	Beginn des einjährigen Aufenthalts in Lausanne, Schweiz im Rahmen des europäischen, universitären Austauschprogramms Erasmus/Sokrates.
Juni/Juli 1999	Famulatur in der Pädiatrie, Hopitaux Universitaires de Strasbourg, Frankreich.
August 1999	Praxisfamulatur in der Praxis von Dr. Cumba, Arzt für Allgemeinmedizin und Facharzt für Chirurgie, Morris, IL, USA.

10 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Anna-Maria Dittrich, daß die vorgelegte Promotionsarbeit mit dem Titel: "Induktionsbedingungen und kostimulatorische Effekte von ICOS – einem neuen T-Zellspezifischen Oberflächenantigen" von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar, auch nicht in Teilen. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind in ihr vollständig angegeben, es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwandt. Das beantragte Promotionsverfahren stellt das erste beantragte Promotionsverfahren dar.