

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Migrationsverhalten von verschiedenen CD4⁺ Subpopulationen *ex vivo* getestet. Im ersten Teil wurde Chemotaxis zu homöostatisch-exprimierten Chemokinen und Expression von Chemokinrezeptoren im murinen sowie humanen System analysiert. Der zweite Teil zeigt Analysen zur Chemotaxis von CD4⁺ T-Zellen zu inflammatorischen/induzierbaren Chemokinen.

4.1. Migration zu konstitutiv exprimierten (homöostatischen) Chemokinen

4.1.1. Bestimmung der optimalen Konzentration

Zunächst wurde die optimale Konzentration der zu testenden Chemokine ermittelt. Hierfür wurden rekombinante gekaufte bzw. selbstproduzierte Chemokine im Bereich zwischen 0,1 und 300 nM (bzw. 1 und 100 nM) ausgetitriert. Die Testbereiche orientierten sich an veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen.

Es wurde die chemotaktische Aktivität von CCL19, CCL21, CXCL12 und CXCL13 auf CD4⁺ T-Zellen aus der murinen Milz getestet:

Die größte Effizienz in der Attraktion CD4⁺ T-Zellen besaßen die CCR7 Liganden CCL19 und CCL21; wie in Abb. 4A gezeigt, gelang es ihnen im Mittel 70 % der eingesetzten T-Zellen in 90 Minuten anzulocken. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (135, 136) war CCL19 potenter in der Anlockung von T-Zellen als CCL21, da das Maximum an chemotaktischer Antwort für CCL19 bei 10 nM, das für CCL21 hingegen erst bei 100 nM lag (Abb. 4A).

Zu dem CXCR4-Liganden CXCL12 migrierten bei einem Optimum von 10 nM ca. 50 %, während der CXCR5-Ligand CXCL13 bei 300 nM nur etwa 18 % der eingesetzten T-Zellen anlockte (Abb. 4B, C).

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration von humanem CCL19 wurde dies an CD3/CD4- doppelt-positiven Zellen aus heparinisiertem humanen peripheren Blut ausgetitriert. Humanes CCL19 zeigte eine geringere Potenz als murines CCL19, so ließen sich zwar

ähnlich effizient (ca. 85 %) $CD4^+$ T-Zellen anlocken, jedoch erst bei einer Konzentration von 300 nM, während der murine Ligand schon bei 10 nM sein Optimum hatte (Abb. 4, 5).

4.1.2. Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR5

Eine FACS-Analyse ergab, dass ca. 11 % der $CD4^+$ Milzzellen und nur 2,5 % der $CD4^+$ Blutzellen positiv für CXCR5 waren (Abb. 6). Die Prozente der CXCR5-positiven T-Zellen aus der Milz mit der Frequenz der migrierten Zellen ließen sich nicht direkt vergleichen, da es sich bei den Migrationsexperimenten um vorangereicherte Memory- Zellen handelte. Durch die Prozedur der Voranreicherung (Panning mit Ratte-anti-Maus-CD8, Ratte-anti-Maus-CD11b, Ratte-anti-Maus-CD62L) banden fast alle $CD4^+$ Zellen eine gewisse Menge an Ratten-Ak und da CXCR5 indirekt, durch einen anti-Ratte-Ak angefärbt wurde, band dieser wiederum an die meisten T-Zellen, so dass die Bestimmung von CXCR5 hier unmöglich war.

4.1.3. Migration zu konstitutiv exprimierten Chemokinen in Homöostase und nach Immunisierung

Als Homöostase wird in dieser Arbeit der Zustand bezeichnet, in dem die Tiere bzw. Menschen keinem akuten oder chronischen Infektionstress ausgesetzt sind. Es wurden hierfür nur klinisch gesunde und bei Präparation pathologisch-anatomisch unauffällige Tiere verwendet, die unter SPF-Bedingungen mit Standardversorgung gehalten wurden. Eine Besiedlung mit für die Tierart obligat pathogenen Erregern konnte hierdurch ausgeschlossen werden. Beim Menschen ließ sich dies schlecht kontrollieren, es wurden allerdings nur Blutproben klinisch gesunder Probanden analysiert.

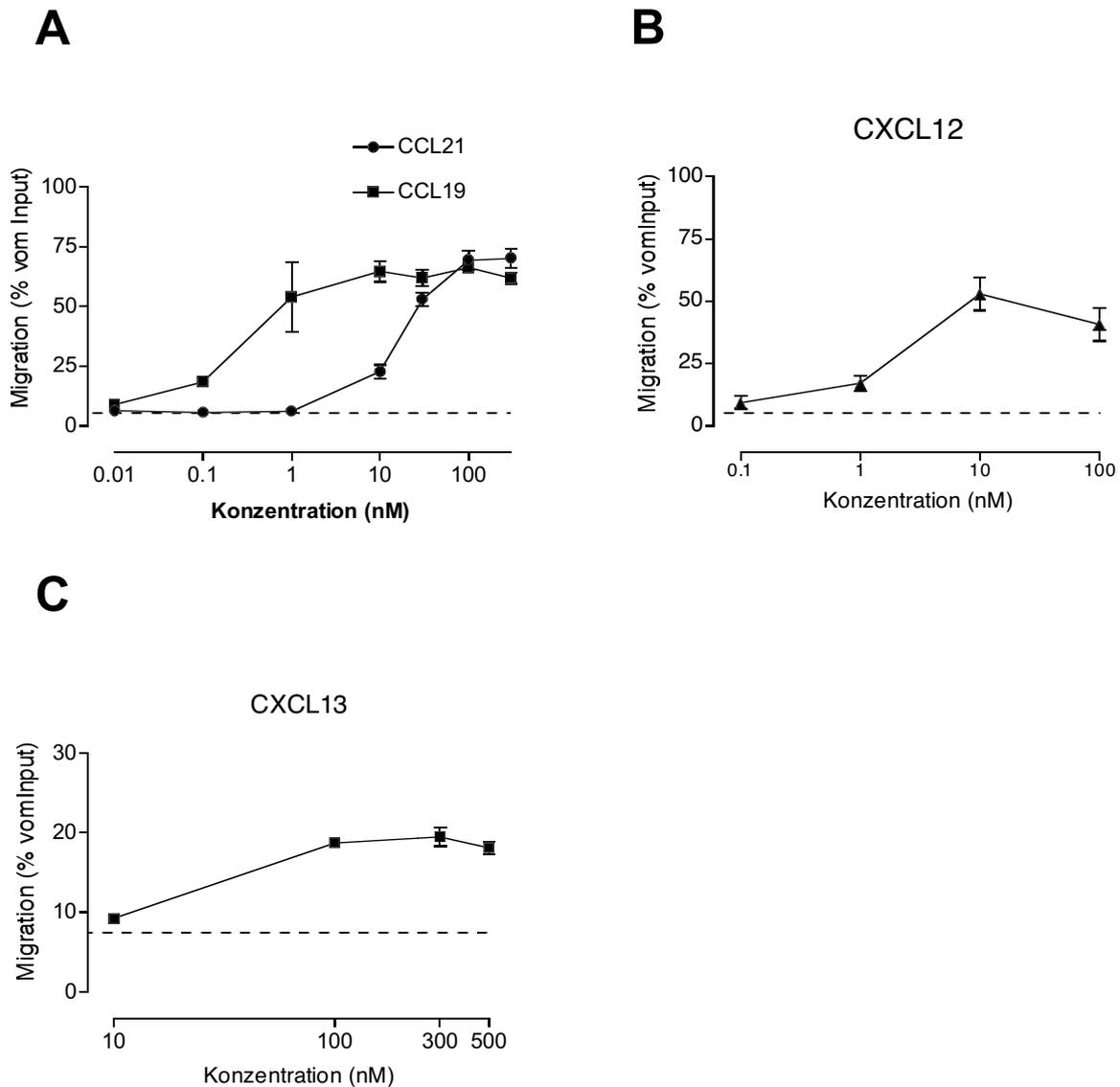


Abbildung 4: Migration muriner CD4⁺ Milzzellen zu verschiedenen Konzentrationen homöostatischer, konstitutiv exprimierter Chemokine.

CD4⁺ T-Zellen wurden nach Anreicherung durch Panning im Chemotaxisassay auf ihre Fähigkeit, zu den CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 (**A**), zu dem CXCR4-Liganden CXCL12 (**B**) und zu dem CXCR5-Liganden CXCL13 (**C**) zu migrieren, getestet, um die optimale Konzentration an Chemokin zu ermitteln. Es wurden pro Konzentrationsstufe 3 Löcher getrennt analysiert und im FACS ausgezählt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Die gestrichelte Linie zeigt die Migration gegen Medium des jeweiligen Versuchs. Die gemessenen Einzelwerte sind im Tabellenanhang angegeben.

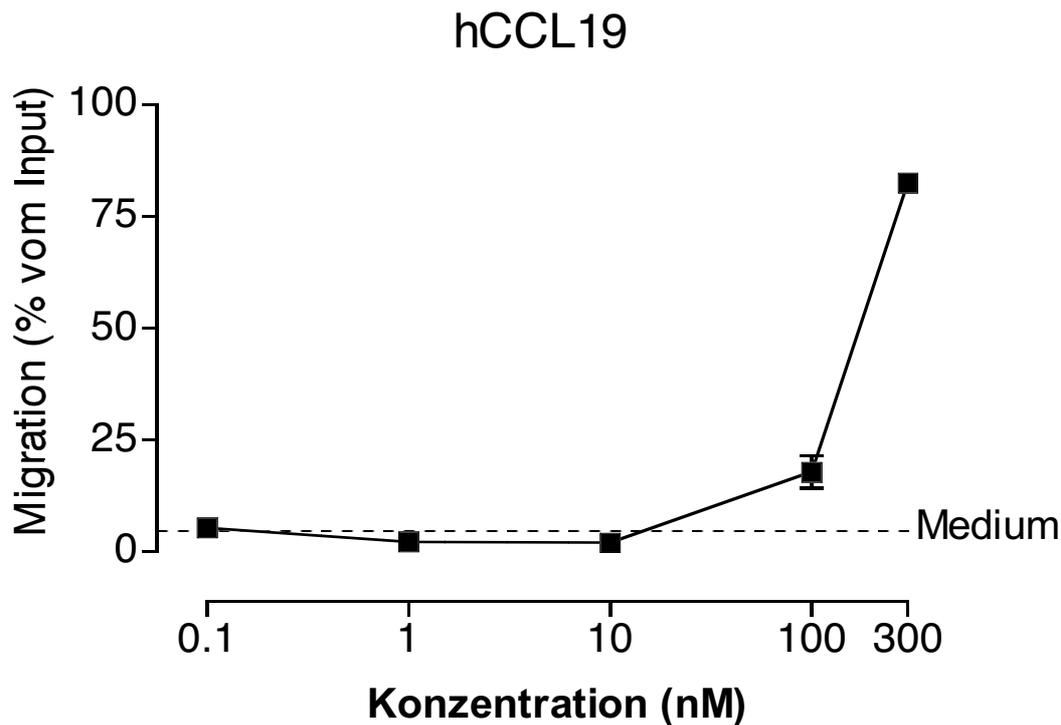


Abbildung 5. Migration CD4/CD3-positiver T-Zellen aus humanem peripheren Blut zu dem CCR7 Liganden CCL19.

CD4/CD3 -doppelt-positive T-Zellen aus dem peripheren Blut eines Spenders wurden nach Dichtegradientenzentrifugation auf ihre Fähigkeit, zu verschiedenen Konzentrationen von humanem (h) CCL19 im Chemotaxisassay zu migrieren, getestet. Es wurden jeweils drei unabhängige Löcher pro Konzentrationsstufe analysiert und im FACS quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD. Die gemessenen Einzelwerte sind im Tabellenanhang angegeben.

4.1.4. Effekt der Immunisierung

Um eine größere Anzahl von zytokinproduzierenden T-Zellen und ein in Aktivierung befindliches Immunsystem zu untersuchen, wurde bei Mäusen folgende Immunisierung durchgeführt:

Die Tiere wurden mit Ova in Alum i.p. immunisiert, nach drei bis neun Wochen folgte dann eine Sekundärimmunisierung mit Ova/PBS durch i.v.-Injektion in die Schwanzvene. Vier Tage nach erfolgter Sekundärimmunisierung wurde das chemotaktische Verhalten der CD4⁺ T-Zellen aus der Milz getestet. Als Effekt der Immunisierung fanden sich eine hyperplastische Milz und Lymphknoten, auch konnten so bis zu zweimal mehr Zellen aus der Milz isoliert werden, als ohne Immunisierung (nicht gezeigt). Die Frequenzen der zytokinproduzierenden

T-Zellen nahm bis Faktor 2 zu, wobei sich auch die Zahl der CD69-positiven T-Zellen (als Marker für frisch aktivierte Zellen, s.u.) verdoppelte (nicht gezeigt). Es kann davon ausgegangen werden, dass sich ohne Immunisierung eher ruhende Memory-Zellen in den Milzen finden, nach Immunisierung sollte der Anteil an Effektorzellen erhöht sein.

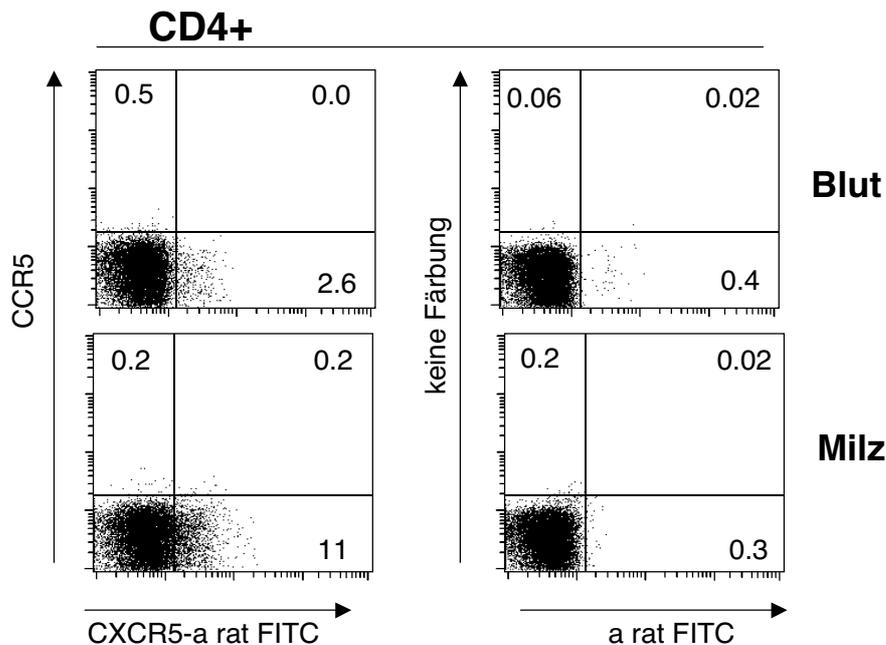


Abbildung 6: Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR5 auf CD4⁺ T-Zellen aus der Milz und dem Blut unbehandelter BALB/c- Mäuse.

Mononukleäre Zellen wurden aus Milzen und Blut von 15 Mäusen durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und im FACS auf die Expression der Rezeptoren untersucht. Dargestellt sind lebende (PI-negative) CD4⁺ Lymphozyten. Abkürzungen: a, anti; rat, Ratte.

4.1.5. Migration aktivierter und ruhender naiver oder Memory T-Zellen zu CCR7

Liganden

Es ist bekannt, dass naive T-Zellen CCR7⁺ sind und zu den korrespondierenden Liganden CCL19 und CCL21 migrieren. Wie weit dies für aktivierte und Effektor/Memory T-Zellen zutrifft, war kontrovers diskutiert (60, 62, 72, 118, 135, 137, 138). Aus diesem Grunde sollte analysiert werden, in welchem Maße Memory- im Vergleich zu naiven T-Zellen zu den in der T-Zone von sekundären lymphatischen Organen exprimierten Chemokinen CCL19 und

CCL21 migrieren. Hierfür wurden T-Zellen aus den Milzen unimmunisierter Tiere analysiert. Wie schon in der Literatur beschrieben (135, 136) und auch schon in Abb. 4 dargestellt, war CCL19 potenter in der Attraktion von T-Zellen als CCL21; wie in Abb. 7 zu erkennen reichte von CCL19 1/10 der Konzentration von CCL21, um mit gleicher Effizienz T-Zellen anzulocken (Abb. 4, 7).

Wenn das Wanderungsverhalten von Memory versus naiven T-Zellen bestimmt werden sollte, durch getrennte Analyse CD62L^{high} (naiv) und CD62L^{low} (Memory) -exprimierender T-Zellen, zeigte sich, dass naive T-Zellen besser migrierten. Memory und naive T-Zellen zeigten eine ähnliche Sensivität gegenüber den CCR7-Liganden CCL19 und CCL21, was an parallelen Kurvenverläufen von CD62L^{low} und CD62L^{high} Zellen und ähnlicher halbmaximaler Konzentration abzulesen ist (Abb. 7A).

Da für *in vitro* aktivierte T-Zellen beschrieben wurde, dass diese CCR7 heraufregulieren und besser gegen seine Liganden migrieren, sollte getestet werden, ob dies auch für *in vivo* voraktivierte Zellen gilt. Zur Analyse wurden Milzzellen für CD45RB, als Memory- und CD69 als Marker für frisch aktivierte Zellen gefärbt. Laut Literatur sind alle naiven T-Zellen CD45RB^{high}, infolge einer Aktivierung wird später weniger bzw. gar kein CD45RB mehr auf der Zelloberfläche exprimiert (139). Hingegen exprimieren wenige Stunden bis Tage nach einem erfolgten TCR-Signal T-Zellen CD69, wodurch sich frisch aktivierte Zellen erkennen lassen (140). In Kontrollexperimenten wurde zuvor ausgeschlossen, dass die Inkubation mit dem eingesetzten Chemokin in der verwendeten Konzentration (100 nM) die Expression dieser Marker während des Kontaktzeitraumes verändert (nicht gezeigt). Abb. 7B zeigt ein typisches Beispiel, wie sich Input und zu 100 nM CCL21 migrierte Zellen für diese Marker im FACS anfärbten.

Die Frequenz der naiven CD45RB^{high} exprimierenden Zellen erhöhte sich geringgradig (hier: von 43,5 auf 45,6 % der CD4⁺ T-Zellen), im Gegensatz dazu nahm die Frequenz CD69⁺ Memory (CD45RB^{low}) T-Zellen ab (hier: von 7,9 auf 5,7 %, Abb. 7B).

Dies zeigte bereits, dass die verschiedenen Subpopulationen eine unterschiedliche Migrationskapazität gegenüber CCL21 hatten. In Abb. 7C sind drei zusammengefasste Versuche dargestellt, in denen diese Marker auf Aliquots eingesetzter und migrierter Zellen gefärbt und anschließend im FACS analysiert wurden. Durch eine Quantifizierung der Gesamtmigration CD4⁺ T-Zellen konnten die sich aus der FACS-Analyse ergebenden Frequenzen in absolute Zahlen umgerechnet und als % vom Input ausgedrückt werden.

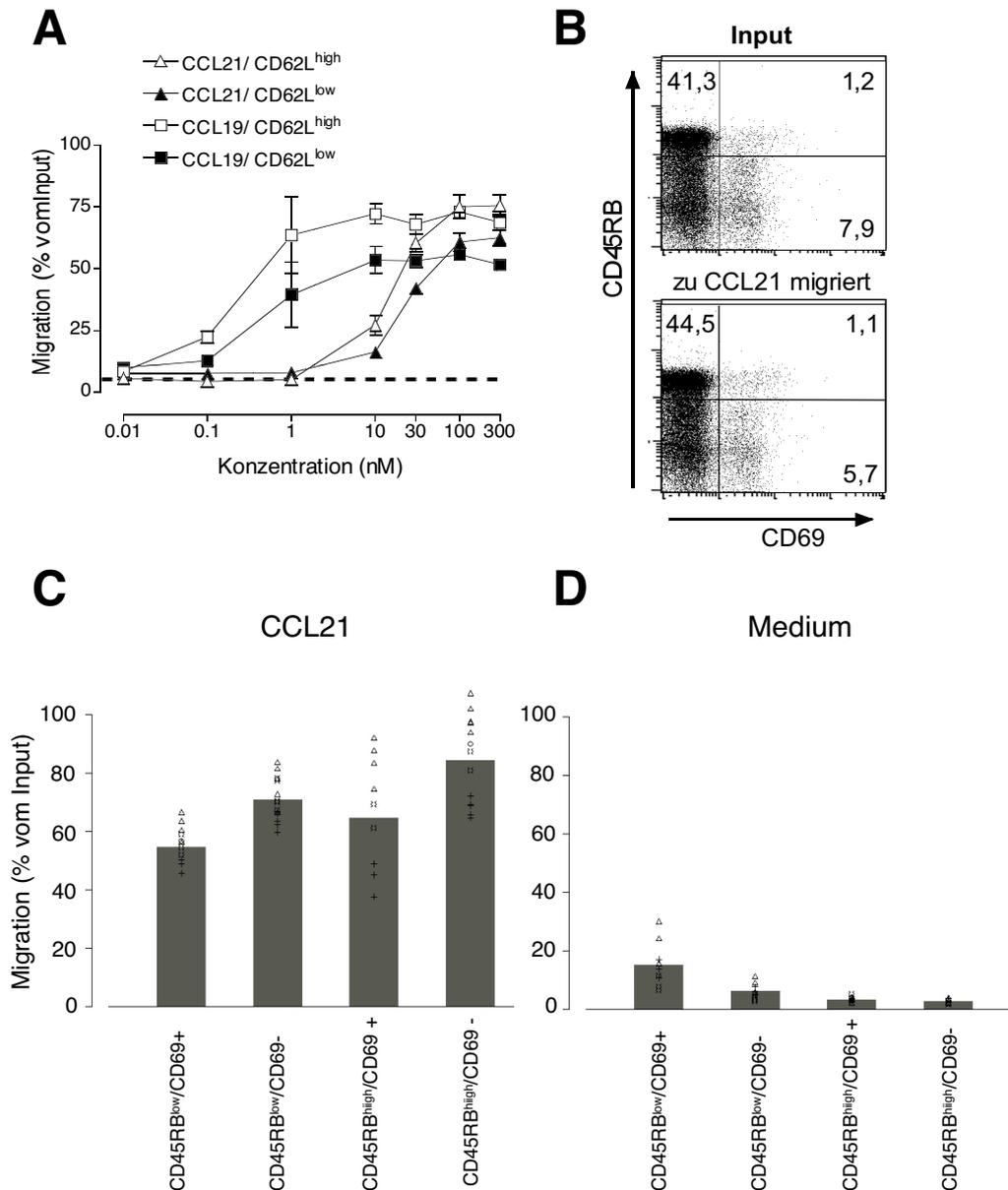


Abbildung 7: Chemotaktische Aktivität von CCL19 und CCL21 auf verschiedene Maus-T-Zellsubpopulationen.

Chemotaxis von CD4⁺ T Lymphozyten aus der Milz zu CCR7-Liganden wurde *ex vivo* getestet und im FACS analysiert und Migration CD4⁺ Zellen in 3 Kammer/Chemokin quantifiziert. Die Ergebnisse sind in % der Ausgangszellzahl der entsprechenden T-Zellsubpopulation (Input) ausgedrückt, die in die untere Kammer migrierte. Pro Versuch wurden für CCL21 5x4 Ansätze, für Medium 1x24 Ansätze migrierter zusammengefasster Kammern mittels Oberflächenfärbung analysiert. **A**, Migration CD62L^{low}- versus CD62L^{high}- exprimierender T-Zellen zu CCL19 und CCL21. Ein typisches von vier unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die gemessenen Einzelwerte sind im Tabellenanhang angegeben. **B**, Durchflusszytometrische Analyse eingesetzter und zu 100 nM von CCL21-migrierter Zellen (gezeigt sind nur CD4⁺ Zellen). **C** und **D**, Migratorische Eigenschaften CD69⁻ und CD69⁺ Subpopulationen von Memory (CD45RB^{low}) und naiven (CD45RB^{high}) CD4⁺ T-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Der Mittelwert und die gemessenen Einzelwerte von drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt, wobei jeder Versuch mit einem anderen Symbol gekennzeichnet ist.

Am besten migrierten zu 100 nM CCL21 nicht-aktivierte naive T-Zellen (CD45RB^{high}/CD69⁻). Eine Aktivierung ging mit einer verminderten Migration einher. Eben solches galt für aktivierte (CD69⁺) Memory (CD45RB^{low}) T-Zellen. Trotz einer Reaktivitätsverminderung aktivierter (CD69⁺) T-Zellen zeigten diese im Mittel immer noch eine ausgesprochen hohe Migrationseffizienz, insofern als noch über die Hälfte der eingesetzten aktivierten Memory T-Zellen (CD45RB^{low}/CD69⁻) migrierte. Gemessen an der Migration gegen Medium ohne Chemokinzusatz hatten aktivierte T-Zellen eine erhöhte Spontanmigrationsrate (7D).

4.1.4. Migration von murinen zytokinproduzierenden (Effektor/Memory) T-Zellsubpopulationen zu CCL21, CXCL12 und CXCL13 in Homöostase und nach Immunisierung

Da homöostatisch exprimierte Chemokine T-Zellen in lymphatische Organe und lymphoide Gewebekompartimente navigieren, war es von Interesse, Effektor/Memory T-Zellen mit solchen Migrationseigenschaften weiter zu charakterisieren.

Hierzu wurden zytokinproduzierende T-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, sich von konstitutiv exprimierten Chemokinen anlocken zu lassen. Es wurden für CD4⁺ und CD62L^{low} durch Panning angereicherte Milzzellen im Chemotaxisassay getestet. Zur Analyse wurden Aliquots der Input-Zellen und 5 bis 36 migrierte Löcher pro getestetes Chemokin gesammelt und polykonal mit PMA/Ionomycin stimuliert.

Anschließend wurden die Zellen für CD4 auf der Oberfläche und nach Fixierung intrazellulär für IL-4, IL-10 und IFN- γ gefärbt. Unabhängig davon wurden CD4⁺ T-Zellen dreier Löcher pro Chemokin bzw. Medium und Input im FACS zusammen mit Zählbeads nach CD4-Färbung quantifiziert.

Bereits beim Vergleich der Zytokin-Frequenzen, durch FACS-Analyse von Input und zu dem CXCR4-Liganden CXCL12 und dem CCR7-Liganden CCL21 migrierten Zellen, ist keine Anreicherung einer bestimmten Zytokinsubpopulation feststellbar (Abb. 8). IL-4 und IFN- γ -positive T-Zellen erscheinen sowohl bei der zu CCL21- als auch zu CXCL12- migrierten Fraktion in ähnlicher Frequenz wie in derjenigen zur Ursprungs-Fraktion (Input), wobei zu CXCL12-migrierte Zellen in der Regel eine leicht höhere Frequenz aller untersuchter Zytokine als im Input aufwiesen (Abb. 8). Dies zeigte bereits, dass die analysierten

Zytokinsubpopulationen eine ähnliche Potenz besaßen, gegen CXCL12 und CCL21 zu migrieren. Entsprechend verhielt es sich, wenn der Versuch mit Zellen aus Ova/Alum-immunisierten Tieren erfolgte (nicht gezeigt).

Ein wenig anders sah es aus, wenn die Migration zu dem CXCR5-Liganden CXCL13 getestet wurde. Abb. 9 zeigt -ohne Immunisierung- eine Anreicherung von IL-10-positiven T-Zellen (hier: fast um den Faktor 3), während andere Zytokinproduzenten weniger stark angereichert erschienen (Abb. 9).

Überraschenderweise reicherten sich nach Immunisierung zusätzlich verstärkt IL-4⁺ Zellen an (Abb. 10). Im Vergleich dazu ist die Migration gegen CCL21 im selben Versuch dargestellt, wo eine geringe Abreicherung IL-10⁺ T-Zellen zu detektieren ist (Abb.10).

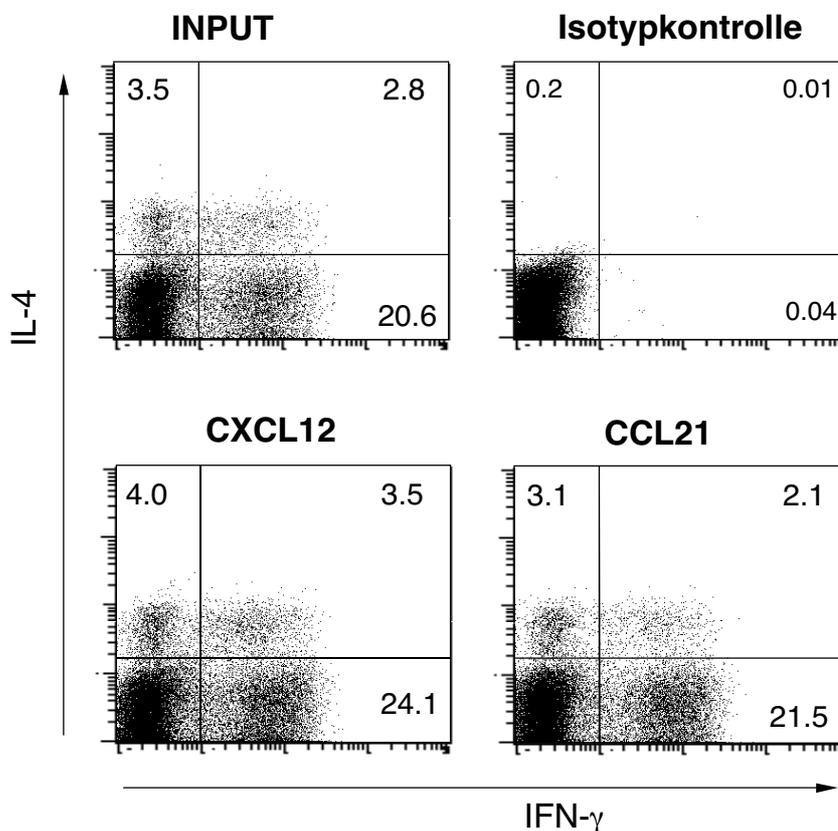


Abbildung 8: FACS-Analyse der Zytokinproduktion CD4⁺ T Zellen von Input und zu CXCL12 und CCL21 migrierten Zellen.

CD4⁺ T-Zellen aus der Milz unbeeinflusster BALB/c-Mäuse wurden auf ihre Fähigkeit getestet, von CXCL12 und CCL21 *ex vivo* im Chemotaxisassay angelockt zu werden. Die Zytokinproduktion der CD4⁺ Input-Zellen vor Migration (obere Reihe) und von CXCL12 und CCL21 angelockten Zellen (untere Reihe) nach PMA/Ionomycin-Stimulation und intrazellulärer Färbung eines typischen Beispiels von vier unabhängigen Versuchen ist dargestellt. Nur CD4⁺ Zellen sind abgebildet. Die in den Dot Plots angegebenen Zahlen geben die prozentuale Verteilung der Zellen in den jeweiligen Quadranten an.

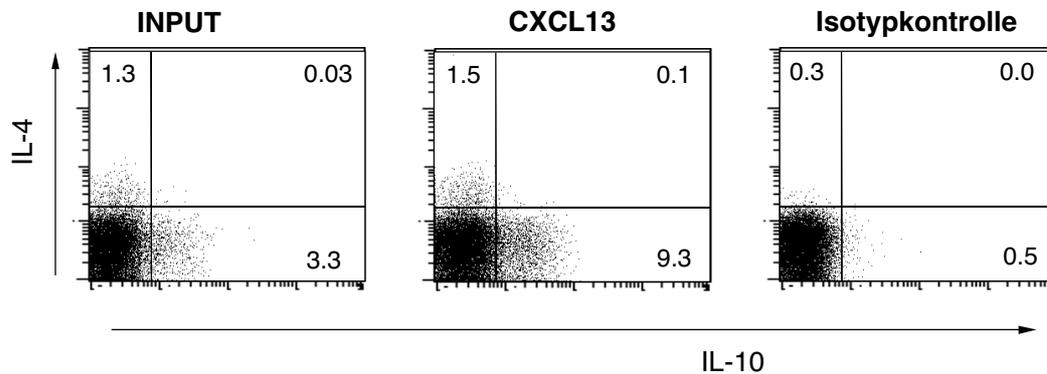


Abbildung 9: FACS-Analyse der Zytokinproduktion CD4⁺ T-Zellen von Input und zu CXCL13 migrierten Zellen.

CD4⁺ T-Zellen aus der Milz unbeeinflusster BALB/c-Mäuse wurden auf ihre Fähigkeit getestet, von CXCL13 *ex vivo* im Chemotaxisassay angezogen zu werden. Die Zytokinproduktion der CD4⁺ Input-Zellen vor Migration und von CXCL13 angezogenen Zellen nach PMA/ Ionomycin-Stimulation und intrazellulärer Färbung eines typischen Beispiels von vier unabhängigen Versuchen ist dargestellt. Nur CD4⁺ Zellen sind abgebildet. Die in den Dot Plots angegebenen Zahlen geben die prozentuale Verteilung der Zellen in den jeweiligen Quadranten an.

Eine detaillierte Analyse der Migration der einzelnen Zytokinsubpopulationen, in der die prozentuale Migration der einzelnen Subpopulation in % der eingesetzten Zellen der betreffenden Subpopulation angegeben ist, ist in Abb. 11 dargestellt. Folgende Subpopulationen wurden getrennt analysiert: IFN- γ einfach-positive („single“), IFN- γ /IL-4 oder IL-10 doppelt-positive, sowie IL-4 und IL-10 einfach-positive und T-Zellen, die negativ für die analysierten Zytokine sind (Nichtproduzenten, „nonproducer“). Es wurden Milzzellen in Homöostase (Abb. 11A) bzw. nach Immunisierung (Abb. 11B) analysiert.

Zu CXCL12, dessen Rezeptor CXCR4 von der Mehrzahl der Leukozyten und T-Zellen exprimiert wird, ist ein Großteil (ca. 60 %) der Zytokinproduzenten und Nichtproduzenten gewandert (Abb. 11). Bei einer Konzentration von 10 nM war keine Präferenz einer bestimmten Zytokinsubpopulation zur Migration gegen dieses Chemokin detektierbar. Nach Immunisierung ergab sich ein ähnliches Bild: Alle analysierten Zytokin-Subpopulationen sind sehr effizient zu CXCL12 gewandert.

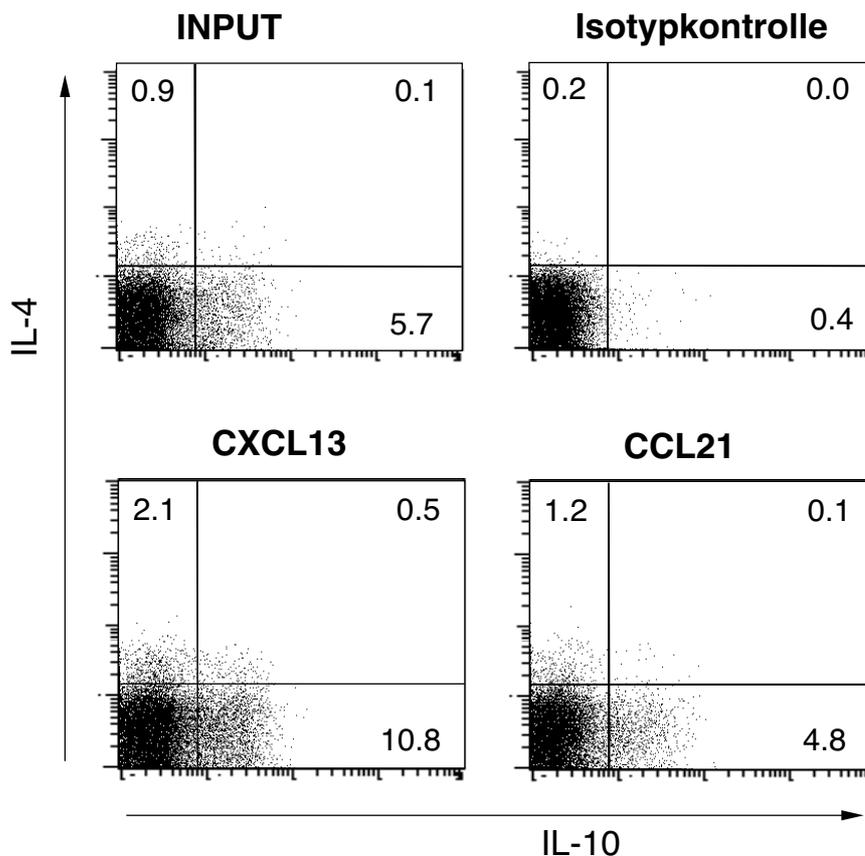


Abbildung 10: FACS-Analyse der Zytokinproduktion CD4⁺ T-Zellen von Input und zu CXCL13 migrierter Zellen nach Sekundärimmunisierung mit Ova.

CD4⁺ T-Zellen aus der Milz Ova/Alum-immunisierter BALB/c-Mäuse, d4 nach Sekundärimmunisierung, wurden auf ihre Fähigkeit getestet, von CXCL13 und CCL21 *ex vivo* im Chemotaxisassay angelockt zu werden. Die Zytokinproduktion der CD4⁺ Input-Zellen vor Migration und von CXCL13 und CCL21 angelockten Zellen nach PMA/Ionomycin-Stimulation und intrazellulärer Färbung eines repräsentativen Beispiels von vier bzw. fünf unabhängigen Versuchen ist dargestellt. Nur CD4⁺ Zellen sind abgebildet. Die in den Dot Plots angegebenen Zahlen geben die prozentuale Verteilung der Zellen in den jeweiligen Quadranten an.

CCL21 lockte im Mittel ca. 60-80 % aller analysierten Zytokin-Subpopulationen und Nichtproduzenten an, wobei IL-10 einfach-positive Zellen in Homöostase eine im Vergleich zu IL-4- oder IFN- γ -einfach-positiven T-Zellen erniedrigte Migrationskapazität gegenüber diesem Chemokin zeigten und im Mittel zu weniger als 40 % migrierten (Abb. 11A). Zwischen der Migrationskapazität IFN- γ und IL-4 einfach-positiver Zellen bestand allerdings kein Unterschied. Nach Immunisierung zeigte sich ein ähnliches Bild: Die Mehrzahl der Effektor/Memory-Zellen migrierte zu CCL21, wobei die Migration der IL-10 einfach-positiven Zellen noch immer vermindert erschien (Abb. 11B).

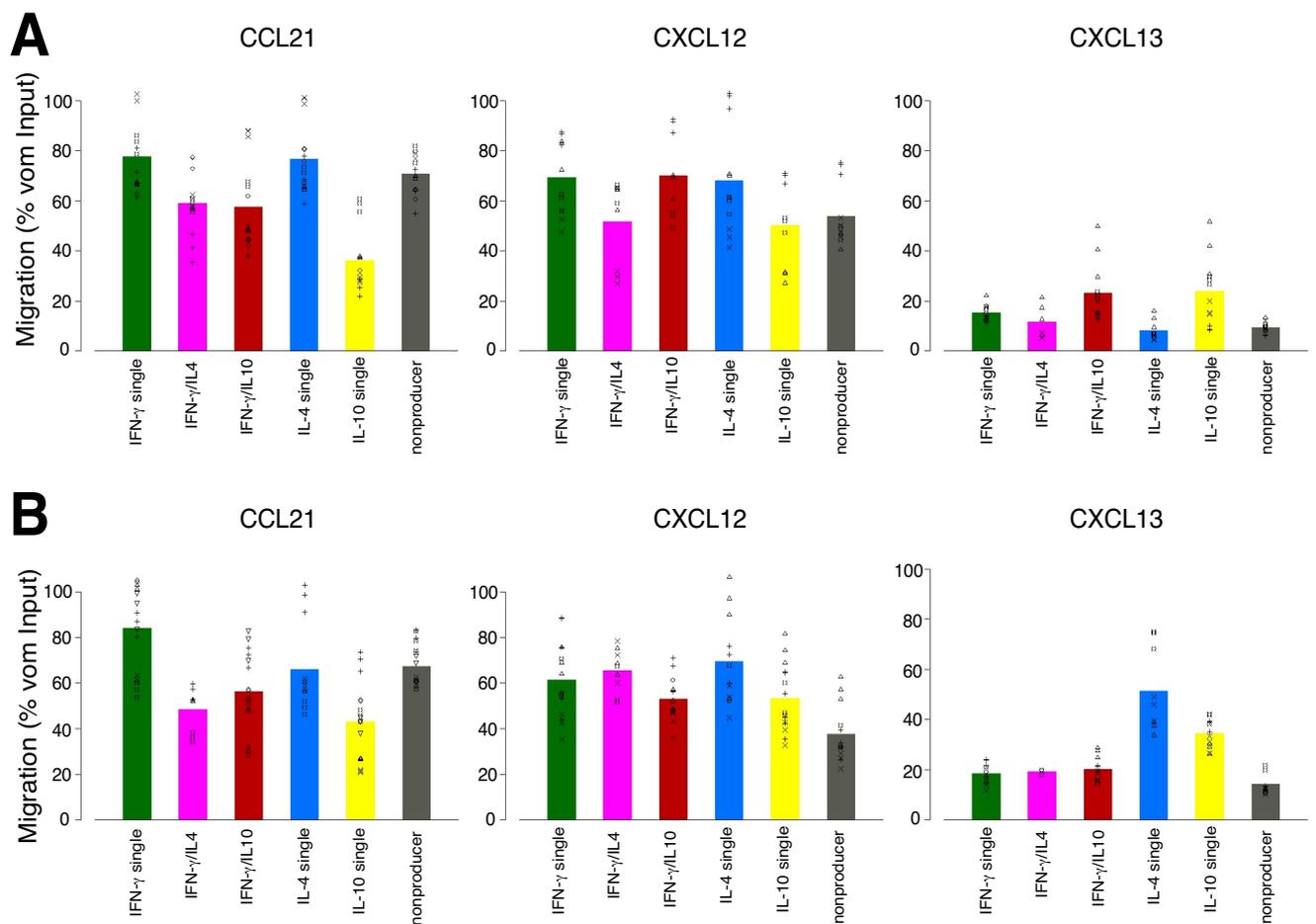


Abbildung 11: Chemotaktisches Antwortprofil verschiedener zytokinproduzierender CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen *ex vivo* zu homöostatischen, konstitutiv exprimierten Chemokinen.

Chemotaxis CD4⁺ Zytokinproduzenten aus Milzen unbeeinflusster (A) oder Ova/Alum-immunisierter BALB/c-Mäuse (B) zu CXCL12, CCL21 und CXCL13 wurde *ex vivo* im Chemotaxisassay getestet und im FACS Migration von CD4⁺ Zellen in drei Kammern/Chemokin quantifiziert. Zur Zytokinanalyse wurden Aliquots von Input- und migrierter Zellen, für 4h mit PMA/Ionomycin stimuliert und intrazellulär für IL-4, IL-10 und IFN-γ angefärbt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz migrierter Zellen der entsprechenden Subpopulation, der in die untere Kammer gelangte. „Single“ bedeutet, dass die Zellen positiv für die angegebene Zytokinsubpopulation, aber negativ für die anderen analysierten Zytokine sind. „Nonproducer“ sind negativ für IL-4, IL-10 und IFN-γ. Der Mittelwert und die gemessenen Einzelwerte von jeweils vier bis fünf unabhängigen Versuchen sind dargestellt, wobei jeder Versuch mit einem anderen Symbol gekennzeichnet ist.

Das in Lymphfollikel und Keimzentrum exprimierte B-Zell-anlockende CXCL13 hat bei seiner optimalen Konzentration von 300 nM im Vergleich zu den anderen untersuchten konstitutiv exprimierten Chemokinen verhältnismäßig wenig T-Zellen rekrutiert. T-Zellen, die den korrespondierenden Rezeptor CXCR5 tragen, waren mit der Eigenschaft beschrieben worden, wenig IL-4 oder IFN- γ , dafür aber IL-10 zu produzieren (79, 80, 82). In Übereinstimmung hierzu war in Homöostase in den Versuchsansätzen eine geringe Bereitschaft aller Zytokinsubpopulationen feststellbar, zu CXCL13 zu migrieren (weniger als 20 % der eingesetzten Zellen), mit Ausnahme der IL-10⁺ Zellen, die zusammen mit den IFN- γ /IL-10-doppelt-positiven T-Zellen am stärksten reaktiv waren und im Mittel zu etwa 25 % migrierten (Abb. 11A).

Nach Immunisierung zeigte sich ein komplett verändertes Bild: IL-4 einfach-positiv T-Zellen waren hier im Mittel fast 60 % Migration, die am stärksten reagierende Fraktion, während IL-10-Produzenten jetzt zu ca. 35 % migrierten. Alle anderen Zytokinsubpopulationen lagen unverändert bei ca. 20 % Migration (Abb. 11B). Die Basalmigration (Migration zu Medium ohne Chemokinzusatz) der einzelnen Zytokinsubpopulationen wird später in Abb. 23 dargestellt.

4.1.5. Ist CCR7 der verantwortliche Rezeptor für die Chemotaxis von Effektor/Memory T-Zellen zu CCL21?

Um andere Rezeptoren als CCR7 für die Migration zu CCL21 auszuschließen, wurde die Chemotaxis zu CCL21 mit T-Zellen aus CCR7-defizienten- und Wildtyp-Mäusen der gleichen Zucht getestet. Die Tiere wurden in der Arbeitsgruppe von Martin Lipp (MDC) erzeugt und gezüchtet (68). Da sich diese Tiere auf einem gemischten genetischen Hintergrund befanden (BALB/c x 129Sv) und die bisherigen Experimente ausschließlich mit BALB/c-Mäusen durchgeführt wurden, musste zunächst überprüft werden, ob auch Effektor/Memory T-Zellen aus der 129Sv-Maus eine effiziente Chemotaxis zu CCR7-Liganden zeigen. Hierzu wurde die Migration im Chemotaxisassay von CD4⁺ Zytokinproduzenten *ex vivo* zu CCL21 aus BALB/c- mit denen aus 129Sv-Mäusen verglichen. Abb. 12 zeigt, dass sich Effektor/Memory T-Zellen aus beiden Mausstämmen effizient von CCL21 anlocken ließen.

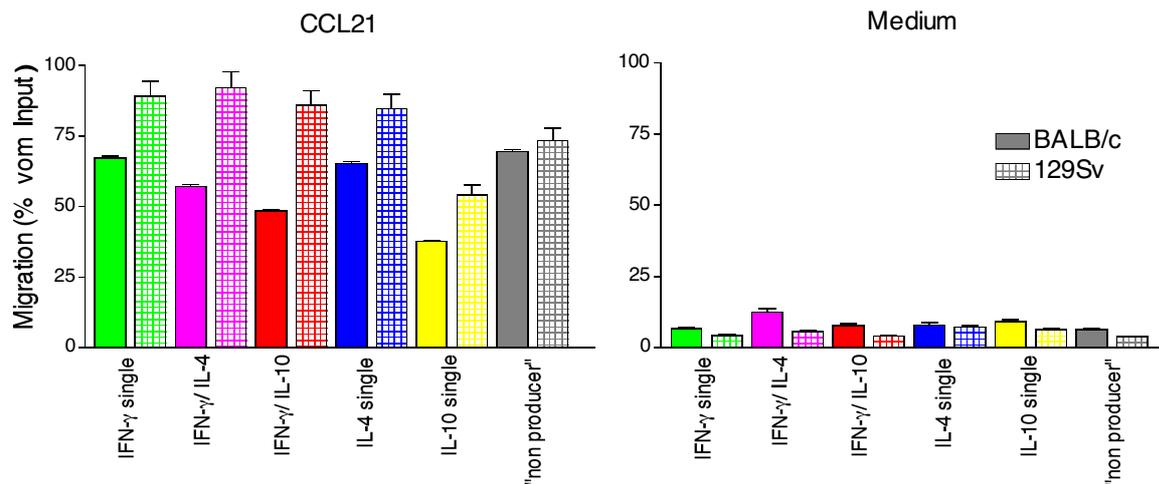


Abbildung 12: Chemotaktisches Antwortprofil verschiedener zytokinproduzierender CD4⁺ T-Zellsubpopulationen *ex vivo* zu CCL21 von BALB/c und 129Sv-Mäusen.

Chemotaxis CD4⁺ Zytokinproduzenten aus Milzen von Mäusen auf 129Sv- und BALB/c- Hintergrund zu CCL21 und Medium wurde *ex vivo* getestet, im FACS analysiert und Migration CD4⁺ Zellen in drei Kammern/Chemokin quantifiziert. Zur Zytokinanalyse wurden Aliquots von Input- und migrierten Zellen für 4h mit PMA/ Ionomycin stimuliert und intrazellulär für IL-4, IL-10 und IFN- γ angefärbt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz migrierter Zellen, der entsprechenden Subpopulation, der in die untere Kammer gelangte. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD eines durchgeführten Versuchs. Die gemessenen Einzelwerte sind im Tabellenanhang angegeben.

Nun konnten die Versuche mit CCR7-defizienten- und Wildtyp-Mäusen durchgeführt werden. Die Wildtyptiere waren, je nach Versuch, Wurfgeschwister bzw. Geschwister oder ähnlich eng verwandte Tiere, die in Gruppen gleichen Geschlechts und Alters eingesetzt wurden. Abb. 13 zeigt, dass CCR7-Wildtyp-Zellen die gleiche hohe Bereitschaft zur Chemotaxis gegen CCL21 besaßen, wie auch schon in vorigen Experimenten für T-Zellen aus BALB/c-Mäusen gezeigt (Abb. 13A). Hingegen wiesen CCR7-defiziente Zellen eine der Basalmigration entsprechende, reduzierte Migration zu CCL21 auf (Abb. 13A, B). CCR7^{-/-} und CCR7^{+/+} T-Zellen zeigten allerdings die gleiche Migrationskapazität gegen CXCL12 zu migrieren, so dass ein genereller Migrationsdefekt CCR7-defizienter Zellen ausgeschlossen werden konnte (Abb.13C). Somit benutzten CD4⁺-Effektor/Memory-Zellen keinen anderen Rezeptor als CCR7, um in diesen Versuchsansätzen (Abb. 11-13) gegen CCL21 zu migrieren. Um dies noch weiter abzusichern, wurden die beiden CCR7-Liganden CCL21 und CCL19 an CCR7-defizienten- T-Zellen austitriert. Abb. 13D zeigt, dass CCR7-defiziente-Memory (CD62L^{low}) und naive (CD62L^{high}) T-Zellen zwischen 1 und 500 nM keine Reaktivität zu diesen Chemokinen zeigten.