

verwunderlich, da bekannterweise die Einwanderung in dieses Organ unabhängig von CCR7 und seinen Liganden erfolgt (68, 69).

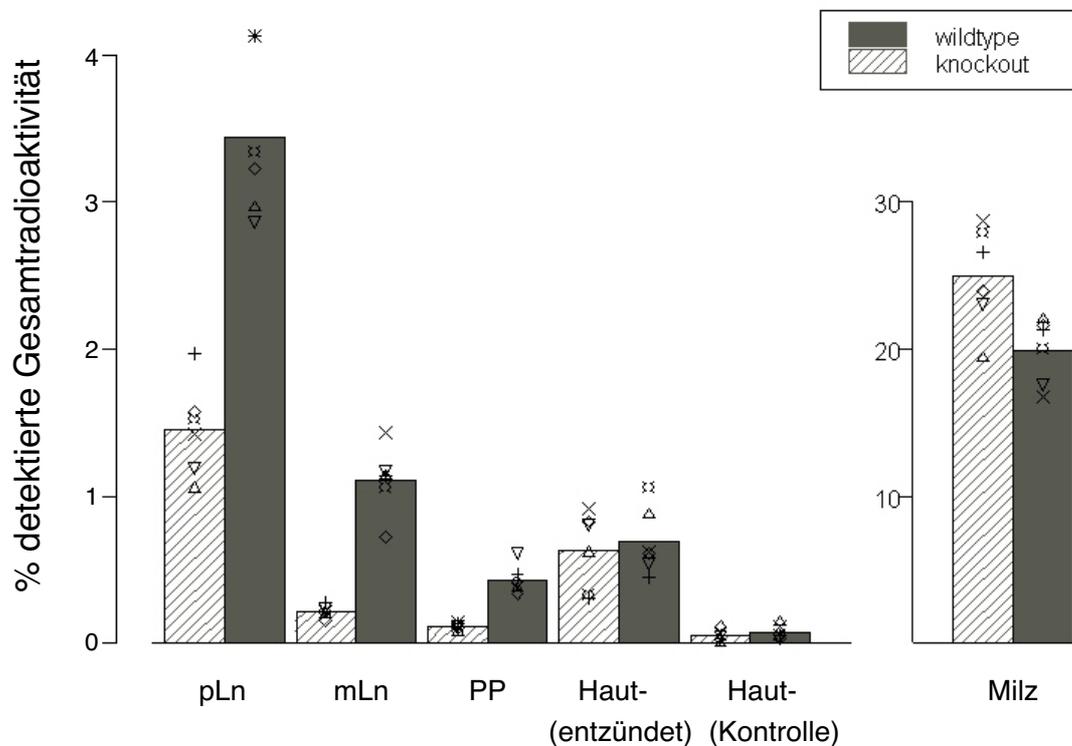


Abbildung 19: Homing *in vitro* erzeugter Th1-Zellen von CCR7^{-/-} und CCR7^{+/+} Tieren in lymphatische Organe und die entzündete Haut.

Durch polyklonale Stimulation differenzierte Th1-Zellen aus CCR7-Wildtyp (wildtype) bzw. CCR7-defizienten (knockout) Tieren wurden am Tag 6 der Kultur radioaktiv mit ⁵¹Cr markiert und i.v. über die Schwanzvenen in BALB/c-Mäuse übertragen, die an jeweils einer Flanke eine DNFB-induzierte Hautentzündung trugen. Nach 3h wurde die Verteilung der Zellen anhand der gemessenen Radioaktivität in Haut, lymphatischen Organen und dem Körperrest ermittelt. Dargestellt ist der Prozentsatz markierter Zellen, der in Haut und lymphatische Organe von sechs Tieren pro Gruppe einwanderte. Es sind der Mittelwert und die gemessenen Einzelwerte jedes Einzeltieres dargestellt, wobei für jede Maus ein anderes Symbol steht. Eines von zwei ähnlichen Experimenten ist abgebildet. Abkürzungen: pLn, periphere Lymphknoten; mLn, mesenteriale Lymphknoten; PP, Peyer'sche Plaques.

4.2. Migration zu induzierbaren (inflammatorischen) Chemokinen in Homöostase und nach Immunisierung

Für eine Reihe von inflammatorischen Chemokinen wurde beschrieben, dass diese differenziell auf Th1- und Th2- Zellen wirken und diese Zellen entsprechende Rezeptoren

tragen. Um zu prüfen, ob dies auch für *in vivo* erzeugte Effektor/Memory-Zellen gilt, wurden eine Reihe inflammatorischer Chemokine im Chemotaxisassay an T-Zellen aus der Milz *ex vivo* ausgetestet.

4.2.1. Bestimmung der optimalen Konzentration

Bevor das Zytokinprofil reaktiver Zellen bestimmt werden konnte, mussten zunächst die wirksamen Konzentrationen eines jeden Chemokins durch Titration ermittelt werden.

Folgende Chemokine zeigten auf CD4⁺ T-Zellen aus der murinen Milz zwischen 1 (bzw. 0,1) und 100 (bzw. 300 nM) eine marginale bis keine Wirkung:

Der CCR2-Ligand CCL2,
der CCR3-Ligand CCL11,
die CCR5-Liganden CCL4 und CCL3,
der CCR6-Ligand CCL20,
der CCR8-Ligand CCL1,
sowie der XCR1-Ligand XCL-1 (Abb. 20A-C).

Der CCR4-Ligand CCL17, sowie der CXCR3-Ligand CXCL9 zeigten hingegen eine deutliche chemotaktische Aktivität auf CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* (Abb. 20C, D).

Da CCL1 und CCL11 als Th2-spezifisch (105-107) und beide CCR5-Liganden als Th1-spezifisch (100-102) bekannt waren, wurden diese Chemokine zusätzlich an *in vitro* differenzierten Th1- und Th2- Zellen ausgetestet. Hierfür wurden zweifach polarisierte Th1-/Th2-Zellen am Tag 6 nach Restimulation zu gleichen Anteilen gemischt und im Chemotaxisassay eingesetzt.

Überraschenderweise zeigten hier beide CCR5-Liganden eine Wirkung auf Kulturzellen, wobei weder CCL1 noch CCL11 eine chemotaktische Antwort hervorriefen (Abb.21A).

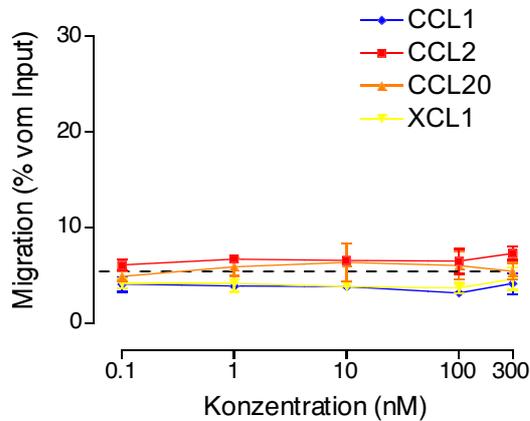
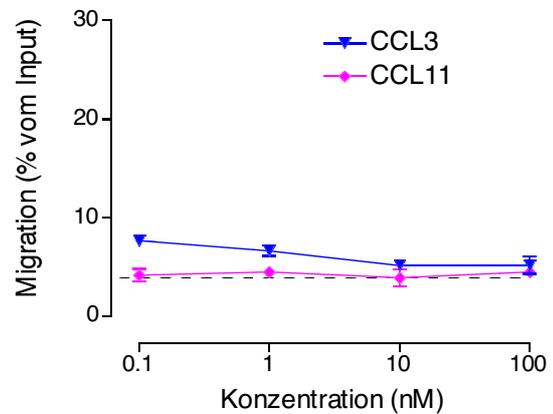
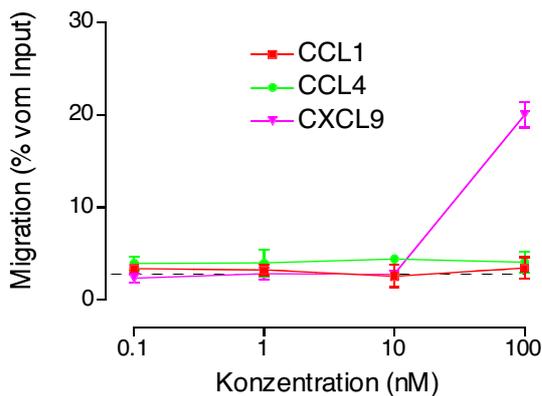
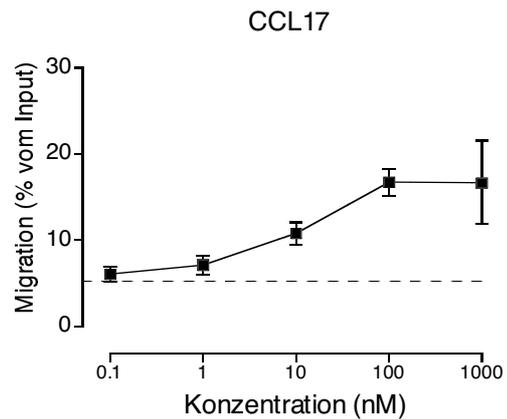
A**B****C****D**

Abbildung 20: Migration muriner CD4⁺ Milzzellen zu verschiedenen Konzentrationen inflammatorischer Chemokine.

CD4⁺ T-Zellen aus Milzen von BALB/c-Mäusen wurden *ex vivo*, nach Anreicherung durch Panning, im Chemotaxisassay auf ihre Fähigkeit, gegen folgenden Liganden zu migrieren, getestet: **A**, der CCR2-Ligand CCL2, der CCR6 Ligand CCL20, der XCR1-Ligand XCL1; **B**, der CCR3-Ligand CCL11 und der CCR5-/CCR1-Ligand CCL3; **C**, der CCR5-Ligand CCL4, der CCR8-Ligand CCL1 und der CXCR3-Ligand CXCL9; **D**, der CCR4-Ligand CCL17. Es wurden pro Konzentrationsstufe/Chemokin drei Kammern getrennt analysiert und im FACS quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD eines Versuchs. Die gemessenen Einzelwerte sind im Tabellenanhang angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen die Migration gegen Medium ohne Chemokinzusatz im jeweiligen Versuch.

Da CCL1 zusätzlich auch als spezifisch für IL-10-produzierende T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften beschrieben worden war (109) und deswegen besonderes Interesse hervorrief, wurde dieses Chemokin zusammen mit CCL11 noch einmal an T-Zellen ausitiert, welche aus einem *in vivo* Th2-Infektionsmodell stammten (Infektion mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis*, erhalten aus Kooperation mit O. Liesenfeld, FU Berlin und K. Bonhagen, DRFZ). Weder T-Zellen aus der Lunge, wo sich die Hauptreaktion gegen den Parasiten abspielt, die durch die Lungenwanderung des Wurmes hervorgerufen wird, noch T-Zellen aus der Milz zeigten eine Reaktion gegen diese Chemokine (Abb. 21B).

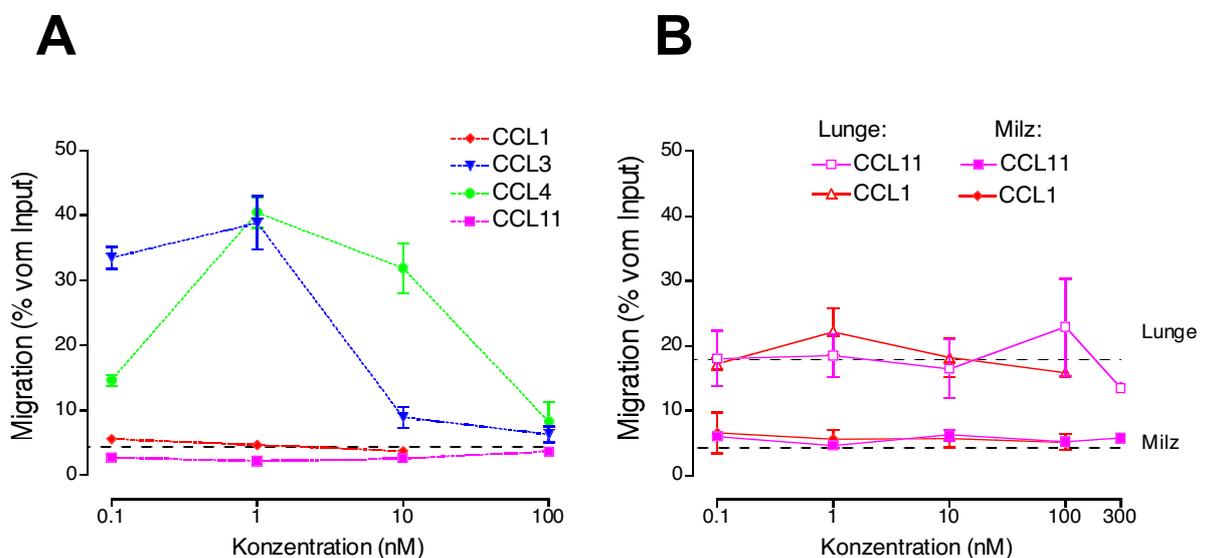


Abbildung 21: Migration muriner CD4⁺ T-Zellen aus Kultur oder Lunge/Milz eines Th2-Infektionsmodells zu verschiedenen Konzentrationen inflammatorischer Chemokine.

A, *in vitro* differenzierte Th1- und Th2- Zellen wurden im OVA-TCR-tg System durch Aktivierung naiver T-Zellen mit APC und OVA unter polarisierenden Bedingungen hergestellt, am Tag 7 unter gleichen Bedingungen restimuliert, am Tag 6 nach Restimulation zu gleichen Anteilen gemischt und Migration zu CCL1, CCL3, CCL4 und CCL11 im Chemotaxisassay getestet. **B**, CD4⁺ T-Zellen wurden an d14 *post infectionem* mit *Nippostrongylus brasiliensis* aus Lunge und Milz von BALB/c-Mäusen isoliert und *ex vivo* im Chemotaxisassay auf ihre Fähigkeit, gegen CCL1 und CCL11 zu migrieren, getestet. Es wurden pro Konzentrationsstufe/Chemokin drei (**A**) oder zwei (**B**) Kammern getrennt analysiert und im FACS quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD. Die gemessenen Einzelwerte sind im Tabellenanhang angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen die Migration gegen Medium ohne Chemokinzusatz im jeweiligen Versuch.

Eosinophile Granulozyten, die gemeinsam mit den T-Zellen aus dem Lungengewebe isoliert wurden, zeigten allerdings eine chemotaktische Reaktion zu CCL11 im Bereich zwischen 10

und 100 nM (nicht gezeigt). Somit konnte sichergestellt werden, dass CCL11, CCL4 und CCL3 eine chemotaktische Aktivität besaßen, auch wenn sie auf Milz-CD4⁺ T-Zellen nicht wirkten.

4.2.2. Migration von murinen zytokinproduzierenden (Effektor/Memory)

T-Zellsubpopulationen zu CXCL9 und CCL17 in Homöostase und nach Immunisierung

Der CCR4-Ligand CCL17 war als ein differentiell Th2-Zellen anlockendes Chemokin beschrieben worden (100, 103). Den korrespondierenden Rezeptor für CXCL9, CXCR3 sollten hingegen Zellen mit Th1-Phänotyp (IFN- γ ⁺) besitzen (100, 103). Aufgrund dieser Beobachtungen war es von großem Interesse, das Zytokinprofil zu CCL17 und zu CXCL9 migrierender T-Zellen *ex vivo* zu bestimmen. Hierfür wurden Milzzellen nach oder ohne Ova/Alum-Immunisierung für CD4⁺ Memory T-Zellen angereichert und im Chemotaxisassay auf ihre Fähigkeit, gegen CCL17 und CXCL9 zu migrieren, getestet. Für die Zytokinanalyse wurden Aliquots eingesetzter Zellen (Input) und 18-36 zusammengefasste Kammern migrierter Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert und intrazellulär für IL-4, IL-10 und IFN- γ gefärbt.

Eine Analyse der Zytokinfrequenzen vor und nach Migration zu CCL17 und CXCL9 zeigt, dass sich bei den von CCL17 angelockten Zellen IL-4-positive Zellen angereichert haben. Unter den zu CXCL9 migrierten T-Zellen fanden sich dafür verstärkt IFN- γ -Produzenten. In dem unter Abb.22 gezeigten Beispiel fand eine Anreicherung bei den zu CXCL9 migrierten CD4⁺ Zellen von 23,4 % auf 57,5 % IFN- γ Produzenten statt. Dagegen reicherten sich bei von CCL17 angelockten T-Zellen IL-4-positive Zellen von 6,3 % auf 16,3 %, an (Abb. 22).

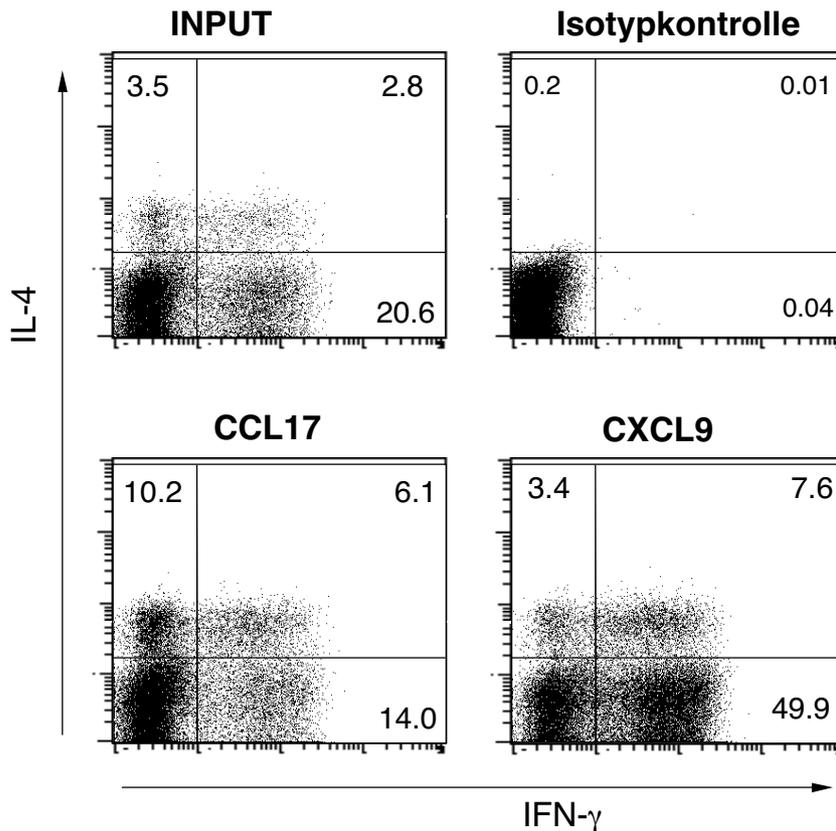


Abbildung 22: FACS-Analyse der Zytokinproduktion CD4⁺ T -Zellen vor und nach Migration zu CCL17 und CXCL9.

CD4⁺ T-Zellen aus der Mäusemilz wurden auf ihre Fähigkeit getestet, sich *ex vivo* von CCL17 und CXCL9 im Chemotaxisassay anlocken zu lassen. Die Zytokinproduktion der CD4⁺ Input-Zellen vor Migration (obere Reihe) und nach Migration (untere Reihe) nach PMA/Ionomycin-Stimulation und intrazellulärer Färbung eines repräsentativen Beispiels von vier unabhängigen Versuchen ist dargestellt. Es sind nur CD4⁺ Zellen abgebildet. In den Dot Plots angegebene Zahlen geben die prozentuale Verteilung der Zellen in den jeweiligen Quadranten an.

Eine detaillierte Analyse der Migrationskapazität der einzelnen Zytokinsubpopulationen nach Quantifizierung bestätigte, dass Migration zu CCL17 an IL-4- Produktion war, während CXCL9 bevorzugt IFN-γ⁺ Zellen anlockte. So migrierten ohne Immunisierung ca. 40 % der IL-4- einfach-positiven („IL-4 single“) und ca. 25 % der IL-4/IFN-γ doppelt-positiven T-Zellen zu CCL17. Alle anderen Zytokinproduzenten und Nichtproduzenten migrierten wenig über dem Mediumniveau. Damit lockte CCL17 präferentiell IL-4⁺ T-Zellen an, wenn auch auf niedrigem Niveau, wobei allerdings auch T-Zellen, die gleichzeitig IFN-γ produzieren, eine deutliche chemotaktische Antwort zeigten (Abb.23A).

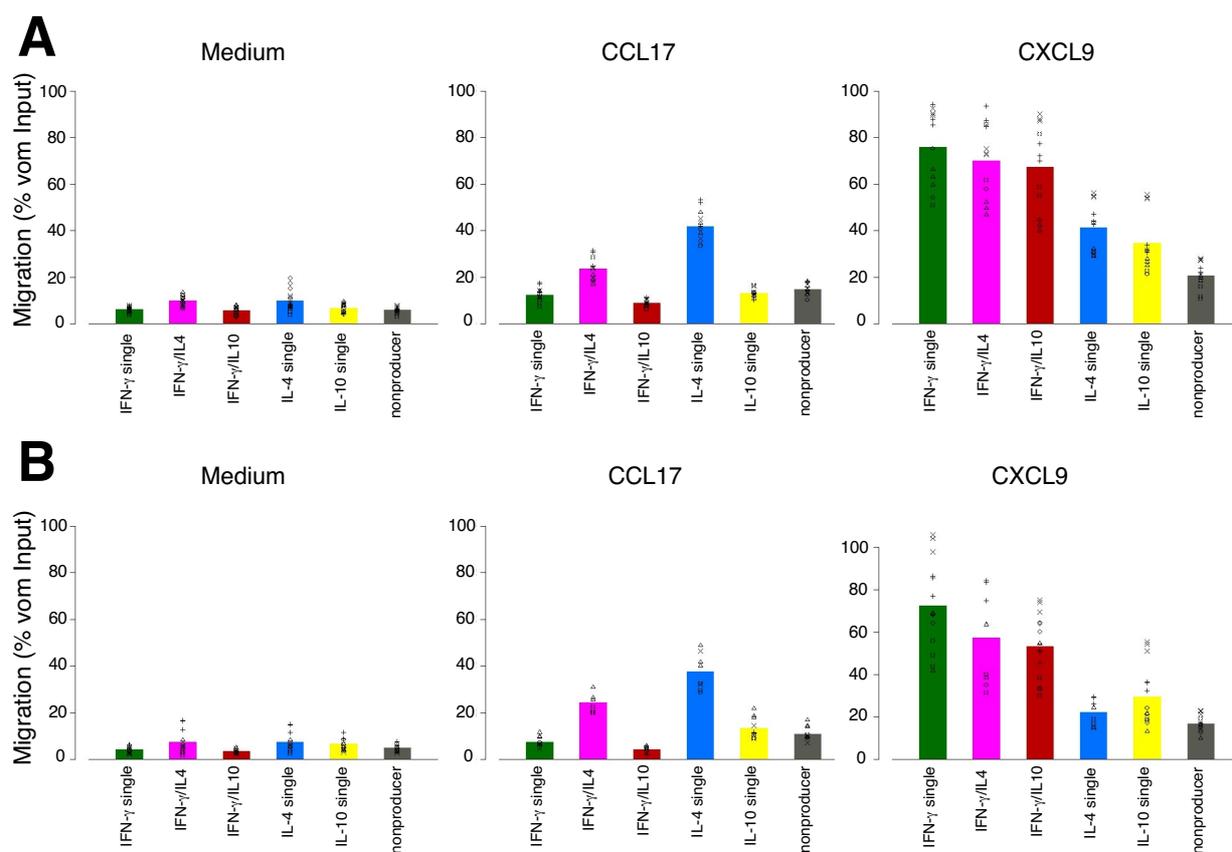


Abbildung 23: Chemotaktisches Antwortprofil muriner Zytokin-produzierender CD4⁺ T-Zellen aus der Milz zu CCL17 und CXCL9.

CD4⁺ Milzzellen aus unbeeinflussten (A) und Ova/Alum-immunisierten BALB/c Mäusen (B) wurden *ex vivo* im Chemotaxisassay auf ihre Fähigkeit, gegen CCL17, CXCL9 oder Medium zu migrieren, getestet, im FACS analysiert und drei migrierte Kammer/Chemokin quantifiziert. Für die 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. Pro Versuch wurden Zellen aus 15 Tieren gemischt. Der Mittelwert und die gemessenen Einzelwerte von jeweils vier bis fünf unabhängigen Versuchen sind dargestellt, wobei für jeden Versuch ein anderes Symbol steht.

Nach Immunisierung fand sich ein gleiches Verteilungsmuster an reaktiven Zytokinsubpopulationen, lediglich auf etwas niedrigerem Niveau: Zu CCL17 migrierten wieder präferentiell IL-4⁺ T- Zellen; es erreichten hier im Mittel knapp 40 % der einfach-

positiven und 20 % der IFN- γ /IL-4-doppelt-positiven T-Zellen die untere Kammer (Abb. 23B).

Zu CXCL9 sind in Homöostase im Mittel ca. 75 % der IFN- γ einfach- („IFN- γ single“) und IFN- γ /IL-4 bzw. IFN- γ /IL-10 doppelt-positiven Zellen migriert. Andere Zytokinsubpopulationen haben deutlich weniger reagiert. So ließen sich ca. 40 % der IL-4-einfach-positiven und etwas weniger der IL-10 einfach-positiven Zellen anlocken (Abb. 23B). Von CXCL9 ließen sich auch nach Immunisierung wieder am stärksten IFN- γ einfach- und IFN- γ /IL-4 oder IFN- γ /IL-10 doppelt-positiv T-Zellen anlocken. IL-10- und IL-4-produzierende T-Zellen sind nach Immunisierung im Mittel etwas weniger stark zu CXCL9 migriert als in Homöostase (Abb. 23A, B).

Insgesamt bestand eine deutliche Präferenz und auch Effizienz von CXCL9, IFN- γ ⁺ T-Zellen zu rekrutieren. Allerdings ließen sich mit dem „Th1-Chemokin“ CXCL9 genauso effizient IL-4 einfach-positiv T-Zellen anlocken, wie beispielsweise mit dem „Th2-Chemokin“ CCL17. Im Gegensatz zu Berichten von Versuchen mit *in vitro* differenzierten Effektorzellen finden sich also mit Effektor/Memory-Zellen *ex vivo* eher quantitative Unterschiede in der Präferenz, gegen CXCL9 oder CCL17 zu migrieren.