

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Antigenspezifische Migration von T-Helfer-Zellen im murinen
Inflammationsmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Saeed Anwar Ghani
aus Halle (Krs. Gütersloh)

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. A. Hamann

2. Prof. Dr. med. J. Sieper

3. Priv.-Doz. Dr. M. Lipp

Datum der Promotion: 09.02.2009

Zusammenfassung

Die Effektorphase adaptiver Immunantworten ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von Lymphozyten im entzündeten Gewebe. Die Einwanderung der Lymphozyten wird vermittelt durch die Interaktion verschiedener Adhäsionsmoleküle. In der Frühphase dominieren Granulozyten das Entzündungsgeschehen, zu späteren Zeitpunkten beherrschen Lymphozyten das Bild und man findet insbesondere eine Akkumulation von Antigen(Ag)-spezifischen Lymphozyten. Der Wirkmechanismus von Antigen für diese spezifische Rekrutierung, Akkumulation oder mögliche lokale Proliferation von Lymphozyten ist jedoch bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit wird der Effekt von lokalem Antigen auf die Migration einer Lymphozytensubpopulation der T-Helferzellen (CD4⁺-T-Effektorzellen) untersucht. Im murinen Hautinflammationsmodell wird gezeigt, dass in der Frühphase einer Immunantwort die lokale Aktivierung von wenigen Ag-spezifischen T-Effektorzellen eine Konditionierung des Entzündungsherdes verursacht, die eine hocheffektive Rekrutierung von weiteren T-Effektorzellen unabhängig von ihrer Ag-Spezifität auslöst. Über einen Zeitraum von Tagen entwickelt sich dann eine Dominanz von Ag-spezifischen T-Effektorzellen im Bereich der Entzündungsreaktion, die wahrscheinlich durch eine lokale Proliferation Ag-spezifischer T-Effektorzellen bedingt ist.

Weiterhin wird gezeigt, dass TNF α die Intensität der T-Zell-abhängigen Entzündung steuert, jedoch nur teilweise die T-Effektorzell-Rekrutierung inhibiert.

Abstract

The effector phase of adaptive immune responses is characterized by the accumulation of lymphocytes in the inflamed tissue. The migration of effector cells to acute inflamed sites requires the interaction of various adhesion molecules. During the initial response granulocytes represent the dominant cell type, while lymphocytes predominate at later time points. Especially antigen (ag)-specific T-cells can be found. The role of antigen for this process is unclear.

Here we show that local activation of ag-specific T-effector cells within the site of inflammation conditions the local environment to promote recruitment of effector cells irrespective of their ag-specificity. However, over a period of several days, ag-specific T-cells dominate within the site of ag-challenge most likely due to recruitment of progeny of ag-specific activated T-cells. Furthermore, does TNF α control the strength of the T-cell dependent inflammation as determined by local swelling but only partially regulates the recruitment of subsequent effector T-cells to the site of ag-challenge.

Schlagwörter:

T-Helferzellen, Entzündung, Migration, Antigen-Spezifität

Keywords:

T-Helper Cells, inflammation, migration, antigen specificity

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	9
1.1 Das adaptive Immunsystem	9
1.2 T-Helferzellen	10
1.3 Th1/Th2-Differenzierung.....	11
1.4 Leukozytäre Migration (Multi-Step-Modell).....	13
1.5 Migrationseigenschaften unterschiedlicher T-Helfer-Zellpopulationen.....	14
1.6 Die Rolle von Antigen für die Akkumulation von T-Effektorzellen Lymphozyten im peripheren Gewebe.....	17
1.7 Zielstellung der Arbeit.....	20
2 Material	22
2.1 Medien und Lösungen	22
2.2 Zusätze zur Zellkultur.....	22
2.3 Antikörper	23
2.4 Radioisotope zur Zellmarkierung.....	24
2.5 Versuchstiere.....	24
3 Methoden.....	25
3.1 Lymphozytenisolation aus der Maus.....	25
3.2 In-vitro-Generierung von CD4 ⁺ -Effektorzellen (Th1-Kultur).....	25
3.3 In-vivo-Entzündungsmodell in der Haut	28
3.4 Migrationsanalysen (Homing Assays).....	32
4 Ergebnisse	34
4.1 In-vitro-Differenzierung Ag-spezifischer und polyklonaler T-Helferzellen	34
4.2 Ag führt zur lokalen Anreicherung Ag-spezifischer Th1-Zellen in der akuten Inflammation	36
4.3 Der Kotransfer von Ag-spezifischen und polyspezifischen T-Effektorzellen führt zur Ansammlung von T-Effektorzellen unabhängig von ihrer Ag-Spezifität	38
4.4 Der Einfluss der radioaktiven Markierung auf die leukozytäre Migration.....	40
4.5 Die Modulation des Inflammationsherdes durch lokale Aktivierung Ag-spezifischer T-Effektorzellen führt zu verstärkter Th1-Zellrekrutierung	43
4.6 Mechanismen der Konditionierung: Einfluss von TNF α auf die Konditionierung des Gewebes.....	44
4.7 Die Spätphase der Inflammationsphase ist dominiert von einem Ag-spezifischen T-Effektorzellinfiltrat	47
5 Diskussion	51
5.1 Die Präsenz von spezifischem Antigen führt zur Aktivierung weniger ortsständiger Ag-spezifischer T-Effektorzellen mit Konditionierung der lokalen Entzündungsregion	52
5.2 Die sekundäre Akkumulation von T-Effektorzellen erfolgt unabhängig von deren Ag-Spezifität	53
5.3 Die Dominanz Ag-spezifischer T-Effektorzellen im Ag-exponierten Inflammationsgebiet entwickelt sich im Verlauf über Tage.....	54

5.4 Die Bedeutung von TNF α	55
5.5 Die Rolle des Endothels in der Ag-spezifischen Effektorzell-Migration	56
5.6 Die T-Effektorzell-Migration in nicht inflammatorische Organe	56
5.7 Methodische Limitationen der Untersuchung Ag-spezifischer T-Effektorzell-Migration.....	57
5.8 Modell der Migration Ag-spezifischer T-Effektorzellen.....	58
6 Zusammenfassung	61
7 Literaturverzeichnis	62
8 Danksagung	72
9 Lebenslauf	73
10 Eidesstattliche Erklärung.....	74

Widmung

meinem Vater

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BCR	B-Zellrezeptor
BrefA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CD62L	L-Selektin
CFSE	Carboxy-fluoresceindiacetatsuccinimidylester
d	day (Tag)
DC	Dendritische Zelle
DTH	delayed type hypersensitivity
ED	Enzephalitis disseminata
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEV	hochendotheliale Venolen
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFA	Inkomplettes Freundesches Adjuvans
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
k. o.	knock out
LN	Lymphknoten
MACS	Magnet-aktivierte Zellsortierung
MAdCAM	mucosal adhesion cellular adhesion molecule
MHC	Major Histocompatibility Complex
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSGL	P-Selektin-Liganden
S1P1	Sphingosin-1-Phosphat
SPF	spezifiziert pathogenfreie Bedingungen
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	Transgen
Th- Zellen	T-Helfer-Zellen
Th _{eff/mem}	Th-Effektor-/Memory-Zellen
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
wt	Wildtyp

Einleitung

1.1 Das adaptive Immunsystem

Das Immunsystem dient u. a. zur Erkennung und Abwehr von vielfältigen mikrobiellen Erregern wie Bakterien, Viren oder Pilzen und es schützt den Organismus, indem es entdifferenzierte oder mutierte Zellen zerstört und so deren malignes Wachstum verhindert.

Hierfür sind verschiedene humorale und zelluläre Mechanismen wichtig. Höhere Wirbeltiere sind gekennzeichnet durch die Ausbildung eines spezifischen zellulären Abwehrsystems, das über eine differenzierte Strukturerkennung, die Ag-Präsentation, aktiviert wird. Diese erlaubt eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und Fremdstrukturen, die eine Immunantwort induzieren bzw. zur Toleranz führen.

Antigene sind Teilstücke von Proteinen etwa von phagozytierten Erregern, Viruspartikeln oder Selbstproteinen aus dem endogenen Proteinumsatz. Nach intrazellulärem Verdau werden diese Teilstücke der Proteine an spezielle Proteine, den Major Histocompatibility Complex-Moleküle (MHC), gebunden. Diese – verankert in der Zellmembran – präsentieren dann das Antigen an der Zelloberfläche. Zum einen geschieht dies über MHC-Klasse-I (MHC-I)-Moleküle, die von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Teilstücke von Selbstproteinen aus dem intrazellulären Proteinumsatz werden hier beispielsweise präsentiert. Zum anderen werden extrazelluläre Fremdproteine präsentiert durch spezialisierte Zellen des Immunsystems, so genannte „Ag-präsentierende Zellen“ (APC), wie dendritische Zellen und Makrophagen. Diese präsentieren charakteristischerweise Teilstücke phagozytierter Antigene über MHC-II-Moleküle dem zellulären Abwehrsystem, also T-Helfer- und B-Zellen. Diese Interaktion wird in direktem Zellkontakt über einen strukturerkennenden Rezeptor vermittelt. T-Zellen interagieren über den T-Zell-Rezeptor (TCR) und B-Zellen über den B-Zellrezeptor (BCR) mit MHC-Molekülen, die mit dem Fremd- oder Selbstprotein beladen sind.

Im Folgenden wird auf die Funktion von T-Helferzellen eingegangen. Diese erkennen Antigen über den TCR, der mit Ag-beladenen MHC-II Komplexen interagiert. Dies führt im Beisein weiterer Corezeptoren (CD3 und CD4 bei T-Helfer-Zellen) zur Signalübertragung. In Abhängigkeit von diesen costimulatorischen Signalen, die von Zellsubset, Differenzierungs- und Aktivierungsstatus der APC abhängen, kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. B- und T-Helfer-Zellen werden auf diese Weise in Proliferation, Differenzierung, Aktivierung oder dem programmierten Zelltod kontrolliert. Störungen dieses Prozesses können zu Autoimmunerkrankungen führen, wenn etwa eine T-Zell-Aktivierung in peripheren Organen unkontrolliert

geschieht. Das Verständnis der lymphozytären Wanderungseigenschaften und der Dynamik der T-Zellmigration kann daher zur Weiterentwicklung der Therapie von Autoimmunerkrankungen dienen.

1.2 T-Helferzellen

T-Helferzellen sind eine Untergruppe des zellulären Abwehrsystems. Sie gehen im Knochenmark aus der hämatopoetischen Stammzelle hervor. Aus dem Pool dieser sich selbst erneuernden Stammzellen gehen dann multipotente hämatopoetische Vorläufer hervor, die teilweise eine lymphoide Spezifizierung aufweisen[1]. Lymphoid spezifizierte Vorläufer verlassen das Knochenmark und migrieren als früheste intrathymische T-Zell-Vorläufer in den Thymus[2]. Die weitere Ausreifung in naive T-Zellen erfolgt über verschiedene lymphoide Vorläuferstadien mit unterschiedlicher Potenz zur Differenzierung. Ergebnis der Reifungsprozesse über positive und negative Selektionsschritte sind naive zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$) oder T-Helferzellen ($CD4^+$), die einen funktionsfähigen Rezeptor zur Strukturerkennung, den T-Zell-Rezeptor (TCR)[3], tragen[4]. Im Rahmen der thymischen Differenzierung wird so eine funktionsfähige und selbsttolerante T-Zell-Population generiert. T-Helferzellen haben eine wichtige Funktion in der Regulation der Immunantwort durch Produktion von Zytokinen, welche die antimikrobielle Funktion anderer Abwehrzellen steuern, so etwa die Antikörperproduktion von B-Zellen oder die Lyse virusinfizierter Zellen durch zytotoxische T-Zellen[5, 6]. Im Rahmen einer Immunantwort differenzieren sich naive T-Zellen in Effektor- und Gedächtniszellen, die lebenslang persistieren und eine schnelle Immunantwort auslösen können und so das immunologische Gedächtnis bilden. Eine wichtige Funktion für die Regulation der Immunantwort haben die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8, die als Corezeptoren der Aktivierung des TCR dienen. Reife T-Lymphozyten exprimieren ausschließlich CD4 oder CD8. CD8 vermittelt die Interaktion mit MHC-I-Molekülen, die Antigen aus dem intrazellulären Umsatz präsentieren. CD4 vermittelt die Interaktion mit MHC-II-Molekülen, die hauptsächlich von APCs exprimiert werden und die phagozytiertes und Antigen präsentieren. $CD4^+$ -T-Helferzellen können sich in weitere Subsets differenzieren, wie Th1, Th2 oder regulatorische T-Zellen, die unterschiedliche Funktionen ausüben. Th1-Zellen fördern die lokale Entzündungsantwort, u. a. durch Sekretion von zytotoxischen Zytokinen, während Th2-Zellen zur Aktivierung von B-Zellen und Generierung einer B-Zellantwort beitragen.

1.3 Th1/Th2-Differenzierung

Die Entwicklung von Effektor-T-Zellen aus reifen naiven Th-Zellen ist von einer Abfolge definierter Schritte abhängig, die zu einer Population Ag-spezifischer, hochreaktiver T-Zellen führt. Diese beinhaltet die Aktivierung naiver Th-Zellen, Proliferation, Differenzierung zu hochpotenten Effektorzellen mit der Kapazität zur schnellen Zytokinproduktion nach erneutem Antigenkontakt und der systemweiten Verteilung in nicht-lymphoiden Organen.

Aktivierung naiver T-Zellen und Differenzierung in Effektorzell-Subsets

Naive Th-Zellen befinden sich nahezu ausschließlich in sekundären lymphatischen Organen und werden Ag-spezifisch im drainierenden Lymphknoten bei Entzündungsreaktionen oder in der Milz bei systemischen Inflammationsreaktionen aktiviert[7, 8]. Im Verlauf einer Entzündungsreaktion phagozytieren gewebständige APCs (Makrophagen und dendritische Zellen) Ag, prozessieren es, um es auf MHC-II-Molekülen im Beisein von costimulatorischen Signalen zu präsentieren. Gleichzeitig wandern APCs nach Aktivierung und Phagozytose von Antigen vom Ort der Entzündung in den drainierenden Lymphknoten und transportieren damit Antigen aus nicht-lymphatischen, peripheren Geweben in spezialisierte lymphatische Organe. Alternativ kann lösliches Antigen auch direkt in den Lymphknoten durch die afferente Lymphe gelangen, wo es in ein System aus kleinen Kanälen, das die T-Zell-Zone in Lymphknoten durchzieht, mündet. Cytoplasmatische Ausläufer von dendritischen Zellen in den T-Zell-Zonen gelangen durch kleine Lücken in die Kanäle und können hier Ag aufnehmen. Bereits 30 Minuten nach Ag-Deposition in der Haut sind dendritische Zellen(DC) so in der Lage, Antigen im Lymphknoten zu präsentieren[9, 10]. Naive Th-Zellen, die beständig durch das lymphatische Gewebe migrieren, kommen hier in direkten Zellkontakt mit aktivierten APCs. Im Fall der Bindung der Ag-MHC-II-Komplexe an den TCR kommt es, unterstützt durch Bindung von costimulatorischen Molekülen, zu einer Aktivierung der Th-Zelle[9]. Die Aktivierung wird vermittelt durch Ligation des TCR und CD28 auf der naiven T-Zelle durch Ag-Peptid-MHC-II-Komplexe und CD80 und CD86 auf der DC[8]. DCs sezernieren weiterhin Zytokine, die zu einer T-Zell-Proliferation und Differenzierung beitragen. Naive Th-Zellen exprimieren nach Aktivierung CD69 und produzieren Wachstumsfaktoren, wie IL-2- und TNF α -Rezeptor-Moleküle[11]. In Abhängigkeit von der Qualität dieser Aktivierungssignale kommt es zur Proliferation und funktionellen Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen in unterschiedliche T-Helfer-Subpopulationen (s. u.). Nach einer Proliferationsphase, ca. eine Woche nach Ag-Kontakt, verlassen die Effektorzellen den Lymphknoten durch die efferente Lymphe und gelangen ins Blut.

T-Helferzell-Subpopulationen

Entsprechend ihrer Funktion werden T-Helferzellen bisher in Th1-, Th2-, regulatorische Th(T_{reg})- und Th17-Zellen unterschieden. Die verschiedenen Populationen entstehen nach einer Aktivierungsphase (ca. 1-2 Tage) aus naiven T-Lymphozyten. Auf diese folgt eine Ag-unabhängige Proliferationsphase bis zum Tag 4[6, 12]. In dieser Phase kommt es zu einer zellulären Expansion um den Faktor 1.000 bis 10.000[7] mit deutlicher Vergrößerung der aktivierten Lymphknoten. Sowohl costimulatorische Rezeptoren, als auch die von den Ag-präsentierenden Zellen sezernierten Zytokine beeinflussen die spätere funktionelle Differenzierung der T-Zellen. Die Dominanz von $IFN\gamma$ und Interleukin-12 (IL12) und die Abwesenheit von $TGF\beta$ in der frühen Aktivierungsphase führt zur Differenzierung in Th1-Effektorzellen, die gekennzeichnet sind durch die Produktion von $IFN\gamma$, IL2, $TNF\alpha$ und $TNF\beta$ [13-16]. Zu späteren Zeitpunkten der Th1-Differenzierung werden die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR6, die mit inflammationsassoziierten Chemokinen MIP-1 α , MIP-1 β und IP10 interagieren[17, 18] exprimiert.

Th2-Zellen werden durch ein anderes Profil costimulatorischer Signale induziert, insbesondere IL4 in Abwesenheit von $TGF\beta$. Sie spielen eine große Rolle in der Abwehr parasitärer Infektionen und der Vermittlung von allergischen Reaktionen und sind charakterisiert durch die Sekretion der Zytokine IL4, IL5, IL10 und IL13.

Weitere Liniendifferenzierungen in regulatorische oder kürzlich beschriebene Th17-Zellen werden durch andere Kombinationen und costimulatorische Signale vermittelt[19-22]. Regulatorische T-Zellen werden insbesondere durch $TGF\beta$ in der Abwesenheit von IL6 generiert.

Th17-Zellen sind abhängig von $TGF\beta$, IL23, IL6 und $TNF\alpha$. Sie sezernieren vornehmlich IL17. Die Beschreibung der Th17-Zellen hat die Vorstellungen der Regulation von T-Zell-vermittelten Gewebdefekten stark verändert. Die Effektorphase von Autoimmunerkrankungen wie ED, Kontaktdermatitis und der rheumatoiden Arthritis[23-26] wird maßgeblich durch Th17-Zellen unterhalten. Dies hat die Bedeutung der Th1-Zellen für die Entstehung des Gewebsschadens stark in den Hintergrund gerückt. In der Auslösung T-Zell-abhängiger Inflamationsantworten jedoch sind – auch durch die Rekrutierung von Th17-Zellen – Th1-Effektorzellen maßgeblich an der Entstehung einer Inflamationsreaktion beteiligt. Th1-Effektorzellen stehen daher zur mechanistischen Untersuchung der Dynamik Ag-spezifischer Migration von Leukozyten in eine Inflamationsreaktion im Zentrum dieser Arbeit. Funktionelle Kennzeichen von Th1-Effektorzellen sind ihre Fähigkeit zur schnellen Zytokinproduktion nach erneuter Aktivierung, eine geringe Aktivierungsschwelle zur Restimulation, schnelle Proliferation und ihre Fähigkeit,

in periphere, nicht-lymphatische Gewebe unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen, zu migrieren. Sie werden im Folgenden als T-Effektorzellen bezeichnet.

T-Zell-Subsets

T-Zell-Subset	Induzierende Faktoren	Effektorzytokin
Th1	IL12, IFN γ ,	IFN γ
Th2	IL4	IL4, IL10
Th17	IL23, TGF β , IL6	IL17
Treg	TGF β	IL10, TGF β

Migrationseigenschaften

	Zielorgan	Adhäsionsmoleküle
Naive T-Zellen	Lymphknoten	CD62L, CCR7
T-Effektor-Gedächtniszellen	Periphere Gewebe	P-Selektin-Liganden, α 4 β 7, CCR4
zentrale-T-Gedächtniszellen	Lymphknoten, Milz	CD62L, CCR7

Tabelle 1:

Übersicht über induzierende Faktoren und Migrationseigenschaften der unterschiedlichen T-Helferzell-Subsets

1.4 Leukozytäre Migration (Multi-Step-Modell)

Die Einwanderung von Leukozyten und Lymphozyten in verschiedene Kompartimente des Körpers ist essentiell für ihre effektive Funktion im Rahmen der Immunantwort. Während naive T-Zellen zwischen Lymphknoten und Blut zirkulieren, gelangen Effektorzellen schnell in entzündetes Gewebe. Die Einwanderung der Zellen ist ein streng regulierter Prozess, der in mehreren Schritten abläuft und im sogenannten Multi-Step-Modell verdeutlicht wird (siehe 1.5.1)[27-30]. Im Rahmen einer Inflammationsreaktion kommt es durch lokale proinflammatorische Zytokine und Chemokine zur Aktivierung des Endothels mit folgender Expression von Adhäsionsmolekülen. Aktivierte Lymphozyten marginalisieren zunächst im Gefäßbett der Inflammationsreaktion durch niedrig affine Interaktionen zwischen Selektinen und entsprechenden Rezeptoren der Endothelwand. Dieser Prozess führt zur nächsten Phase, dem Rollen der Lymphozyten entlang der Endothelwand. Durch Chemokine, die auf den Endothelzellen in das Gefäßlumen präsentiert werden und entsprechende Rezeptoren auf Lymphozyten binden, erfolgt eine Aktivierung der Lymphozyten („outside-in signalling“), die eine Affinitätssteigerung von Adhäsionsmolekülen, den Integrinen, verursacht („inside-out signalling“)[29, 31-33]. Die Steigerung der Affinität führt zur festen Bindung der Integrine mit den entsprechenden endothelialen Rezeptoren. Die fest adhärierenden, aktivierten Lymphozyten migrieren dann

durch die Basalmembran des Endothels und werden durch Entzündungsmediatoren wie Zytokine in das Entzündungsgebiet gelenkt.

1.5 Migrationseigenschaften unterschiedlicher T-Helfer-Zellpopulationen

Lymphozyten zeigen ein sehr differenziertes Rezirkulationsverhalten abhängig von Subset, Aktivierung und funktioneller Differenzierung. Hier soll insbesondere auf die Migration von (CD4⁺) T-Helferzellen eingegangen werden. Grundlegend unterschieden werden muss zwischen naiven und T-Effektor-/Gedächtniszellen, welche unterschiedliche Funktionen und ein unterschiedliches Migrationsmuster aufweisen. Dieses unterschiedliche Verhalten ist durch eine differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren für lokal und systemisch wirkende Botenstoffe vermittelt.

Erste Arbeiten in den 70er Jahren konnten verschiedene leukozytäre Subsets nachweisen, die sich in ihrem Migrationsverhalten unterscheiden. Gowans und Taub konnten so zeigen, dass Lymphozyten zwischen Blut und ihrem primären Aktivierungsort rezirkulieren, und so zwischen Lymphknoten- und Milz-migrierenden Lymphozyten unterscheiden[34, 35]. Cahil et al. konnten in einem Schafmodell durch selektive Drainage von lymphatischen Gefäßen lymphozytäre Populationen unterscheiden, die selektiv in intestinale und periphere Lymphknoten migrieren[36]. Eine genauere Differenzierung der lymphozytären Migrationseigenschaften konnte jedoch erst nach genauerer Charakterisierung und Differenzierung von naiven und T-Effektor/ Gedächtnis-Zellen durch Oberflächenmarker vorgenommen werden[37, 38].

Naive T-Helferzellen (CD4+)

Während naive Th-Zellen durch lymphoide Organe bei fehlendem Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen rezirkulieren, haben T-Effektorzellen Zugang zu nicht-lymphoidem Gewebe[39]. Die Grundlage für dieses differentielle Wanderungsverhalten ist die koordinierte Regulation von Adhäsionsmolekülen im Verlauf der T-Zell-Differenzierung[17] und -Aktivierung[40]. Naive Th-Zellen exprimieren das Selektin CD62L oder das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CCR7 und LFA-1, um mit Adhäsionsmolekülen, die auf spezialisierten Endothelzellen der Lymphknotenvenolen (high endothelial venoles, HEV) exprimiert werden, zu interagieren[41]. Selektine vermitteln die initiale Marginalisierung und das Rollen der Lymphozyten entlang der Endothelwand durch Interaktion mit den entsprechenden Liganden. Cd62L bindet an PNAd (peripheres Lymphknotenadressin), das vornehmlich auf den Venolen peripherer Lymphknoten exprimiert wird; hingegen bindet das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin das mukosale Adhäsionsmolekül-1 (MAdCAM-1), das

vornehmlich auf hochendothelialen Venolen (HEV) Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe exprimiert wird[42]. HEV präsentieren weiterhin die Chemokine CCL19 und CCL21, die den CCR7-Rezeptor auf den rollenden naiven Th-Zellen aktivieren. Dies führt zu einer Aktivierung des Adhäsionsmoleküls LFA-1 auf den T-Zellen und vermittelt eine starke Bindung an ICAM-1 auf der Endothelwand[32]. Nach Adhäsion migrieren Lymphozyten durch das Endothel und erreichen, gesteuert über einen Chemokingradienten[43], die Lymphfollikel, wo sie in Kontakt zu aktivierten dendritischen Zellen kommen, die eine chemokinvermittelte (CCL 10) Retention naiver T-Helferzellen vermitteln.

Naive Th-Zellen verbleiben ca. einen Tag im Lymphknoten und interagieren mit dendritischen Zellen. Bei Fehlen einer Ag-Präsentation auf MHC-II-Molekülen wandern naive Th-Zellen wieder aus dem Lymphknoten aus. Im Falle der Ag-Erkennung auf MHC-II-Molekülen verbleiben naive Th-Zellen im Lymphknoten[9]. Nach Aktivierung und Retention der naiven Th-Zellen, die zuerst im Schafmodell von Ford und Cahill als „lymphocyte shutdown“[44, 45] bezeichnet wurde, folgt auf eine Proliferations- und Differenzierungsphase die Ausschwemmung der Effektorzellen ins periphere Blut.

Lymphknotenegress

Der Mechanismus der leukozytären Auswanderung aus dem Lymphknoten konnte kürzlich durch die Charakterisierung eines hierfür zentralen Rezeptors entschlüsselt werden. Die Familie der Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren (S1P1) – bisher sind 5 im humanen System bekannt – vermittelt G-Protein gekoppelt ein Migrationssignal[46, 47]. Aktivierte naive Th-Zellen regulieren so nach Ag-Kontakt S1P1-Rezeptoren temporär herunter, verbleiben im Lymphknoten[48, 49] und migrieren nach Reexpression von S1P1-Rezeptoren aus dem lymphoiden Gewebe.

T-Effektor-/Gedächtniszellen

Subsets

Wie schon vorher beschrieben, kommt es in Abhängigkeit von der Qualität der Aktivierung naiver Th-Zellen zur Differenzierung in unterschiedliche T-Effektor- oder regulatorische Th-Zellen. Diese Differenzierung beinhaltet auch die Expression neuer Adhäsionsmoleküle, die es den T-Effektorzellen erlaubt, in nicht-lymphoides Gewebe zu migrieren. Die unterschiedlichen Subsets an T-Effektorzellen können anhand dieses gewebsspezifischen Migrationsmusters weiter unterschieden werden in lymphoides Gewebe, dünndarm- oder hautmigrierende T-Effektorzellen.

Unterschieden wird zunächst die Differenzierung in zentrale Gedächtnis- und periphere Effektor- und Gedächtnis-Th-Zellen. Aufgrund des ähnlichen Immunphänotyps und der Migrationseigenschaften werden Letztere zusammengefasst zu T-Effektor-Gedächtnis („effector-memory“; $T_{\text{eff/mem}}$)-Th1-Zellen[50, 51].

Zentrale Gedächtnis-T-Zellen sind bevorzugt im Lymphknoten lokalisiert und werden nach erneutem Ag-Kontakt erst nach einer Stimulationsphase aktiviert. Sie sind charakterisiert durch die Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L und der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4. $T_{\text{eff/mem}}$ -Zellen hingegen lokalisieren präferentiell in peripherem Gewebe[39, 52] und sind direkt nach Ag-Kontakt in der Lage, Effektorfunktionen mittels Zytokinproduktion aufzunehmen. Basis ihres potenten Gewebshomings ist zum einen das Fehlen von CCR7 oder CD62L, die vornehmlich eine Migration in lymphoide Gewebe vermitteln[53], zum anderen die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle, welche die Migration in peripheres Gewebe vermitteln[50].

Die gewebsspezifische Migration von T-Effektorzellen wird im Rahmen der Aktivierung naiver T-Zellen durch eine gewebsspezifische Induktion von Adhäsionsmolekülen verursacht. $T_{\text{eff/mem}}$ -Zellen, die in peripheren Lymphknoten aktiviert werden, exprimieren in Anwesenheit von IL-12 präferentiell den P-Selektin-Liganden-1 (PSGL-1). Die Liganden für diesen – CD62P und CD62E (P- und E-Selektine) – werden wiederum vorwiegend auf hautassoziierten aktiviertem Endothel exprimiert[54]. Das Endothel entzündeter Hautareale exprimiert vermehrt das Chemokin CCL17 und durch die Expression des korrespondierenden Rezeptors CCR4[18, 55-57] entsteht ein hautspezifisches Adhäsionsmuster. Die Bedeutung dieser Interaktionen für eine hautspezifische Migration wird unterstrichen durch die verminderte Migration von T-Effektorzellen in entzündete Haut in CCR4-, CD62E- oder CD62P-defizienten Mäusen[58].

Ein anderes Verhalten zeigen T-Zellen, die innerhalb mesenterischer Lymphknoten oder Peyers patches aktiviert werden[54, 59]. Hierbei erfolgt eine Induktion des Integrins $\alpha 4\beta 7$ [60, 61] und des Chemokinrezeptors CCR9[62, 63], die eine Migration in mukosales Gewebe vermitteln[64]. Der wichtigste Ligand für das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin ist MAdCAM-1, das in den Venolen der lamina propria exprimiert wird[65]. Die Liganden des Chemokinrezeptors CCR9, CCL25 und TECK, werden hingegen stark von epithelialen Zellen des Dünndarms exprimiert[66]. Gewebsspezifische dendritische Zellen werden für dieses Phänomen der differentiellen Induktion von Adhäsionsmolekülen verantwortlich gemacht[67-70]. Insbesondere Retinolsäure und Vitamin D werden unterschiedlich von diesen DCs verstoffwechselt und führen gewebsspezifisch zur Induktion der entsprechenden Adhäsionsmoleküle[71-73]. Über diese spezifischen Muster der

Expression von Adhäsionsmolekülen können T-Effektorzellen unterschiedliche periphere inflammatorische Gewebe erreichen.

1.6 Die Rolle von Antigen für die Akkumulation von T-Effektorzellen Lymphozyten im peripheren Gewebe

Die effektive Funktion einer ortsspezifischen Inflammationsantwort etwa zur Abwehr von Infektionen oder der Tumorsurveillance wird durch das adaptive Immunsystem potent vermittelt. Die Rolle von Adhäsionsmolekülen und aktivierungsabhängigen Mechanismen für die Ansammlung von T-Effektorzellen in nicht-lymphoiden Geweben ist intensiv untersucht[74]. Die Frage jedoch, welche Rolle die Spezifität der Erkennung bestimmter Strukturen durch den TCR hat, also die Ag-Spezifität, wird seit den 70er Jahren untersucht und weiterhin kontrovers diskutiert. Zunächst wurde gezeigt, dass T-Zellen nach Ag-Kontakt aus der Zirkulation verschwinden und sich im Ag-drainierenden Lymphknoten lokalisieren[75-77] und von dort ca. 30 h nach Aktivierung auswandern. Diese Arbeiten konnten zwar nicht zwischen unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen unterscheiden, da die leukozytären Oberflächenmoleküle noch nicht beschrieben waren, dennoch konnte über selektive Lymphdrainage die Lymphozytenmigration verfolgt werden. Diese Arbeiten begründeten das Konzept des T-Zell-„Trappings“, die selektive Retention von Lymphozyten. Nach Charakterisierung der lymphozytären Oberflächenepitope und der funktionellen Beschreibung lymphozytärer Subsets konnte dann das Phänomen der Retention von Lymphozyten genauer beschrieben werden. Eine Reihe von Untersuchungen zeigte eine Abnahme von Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen aus der Zirkulation und eine Anreicherung dieser Zellen innerhalb von Entzündungsherden im Mausmodell[39, 78-80]. Auch in weiteren Spezies gelang der Nachweis einer selektiven lymphozytären Migration, so z. B. in Ratten[81, 82], Schafen[76] und dem Menschen[83]. Schließlich gelang im TCR-transgenen Tiermodell mit genau definiertem Antigen der Nachweis einer Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen in Inflammationsreaktionen, die Antigen enthalten. Dies konnte zum Beispiel in Autoimmunreaktionen[84-86] und in Infektionsmodellen[87] demonstriert werden. Dieser Prozess der Ag-spezifischen Migration hat für viele Prozesse, wie die Infektabwehr, die Regulation von Autoimmunprozessen und eine effektive Tumorsurveillance, eine große Bedeutung. Die Rolle von Antigen auf die Migration von Ag-spezifischen T-Effektorzellen im Gegensatz zu nicht spezifischen, polyklonalen T-Effektorzellen wurde bisher nicht untersucht und wird daher im Folgenden beschrieben. Dies erlaubt eine Abgrenzung aktivierungsabhängiger Mechanismen von Antigen-abhängigen Mechanismen in Entzündungsreaktionen.

Mechanismen des Trappings von T-Effektorzellen

Der deutlichste Hinweis für die Existenz eines Ag-spezifischen Trappings von T-Effektorzellen kam durch die Arbeiten von Reinhardt et al., die eine Akkumulation von Ag-spezifischen CD4⁺-T-Effektorzellen in einer Hautinflammation im Verlauf von wenigen Wochen einer akuten Entzündungsreaktion nachweisen[87, 88]. Die Dynamik dieses Prozesses, insbesondere die Kinetik der leukozytären Immigration, wurde hier jedoch nicht näher untersucht. Antigen kann dabei theoretisch die Akkumulation von T-Effektorzellen auf mehreren Ebenen beeinflussen. So kann erstens der Schritt der Emigration oder Extravasation aus dem Blutstrom in das Gewebe z. B. durch endothelständige Ag-Präsentation beeinflusst werden. Zweitens kann die Dauer der APC:T-Zell-Interaktion durch Antigen beeinflusst werden und drittens kann der Egress der Zellen z. B. durch eine aktivierungsabhängige Regulation der dafür benötigten Rezeptoren beeinflusst werden.

1. Ag-spezifische Adhäsion von T-Effektorzellen am aktivierten Endothel

Eine Rolle für die Ag-spezifische Ansammlung von Th-Zellen wurde durch eine endothelassoziierte Ag-Präsentation postuliert, die eine direkte Bindung von Ag-spezifischen Th-Zellen am Endothel von Inflammationsreaktionen erlaubt[89-91]. Humanes Endothel exprimiert konstitutiv MHC-II-Moleküle und in vitro konnte eine Ag-spezifische Interaktion zwischen humanen Th-Zellen und dem Endothel nachgewiesen werden[92]. Murines Endothel ist erst nach IFN γ -Stimulation in der Lage, MHC-II-Moleküle zu exprimieren[93, 94], doch konnten in vivo Untersuchungen keinen Effekt der endothelialen Ag-Präsentation für eine selektive Migration zeigen[95]. Der Mechanismus der endothelialen Ag-Präsentation scheint daher eine nachgeordnete Rolle für die leukozytäre Migration zu spielen[92, 96, 97].

2. Einfluss der Interaktion zwischen APC und T-Zellen auf die T-Effektorzell-Migration

Große Widersprüche existieren über die Vorstellungen zur Dauer der T-Zell:APC-Interaktion im Gewebe, um eine Ag-spezifische Nettoansammlung von Th-Zellen zu erklären. Für ein APC-vermitteltes Ag-spezifisches Trapping sprechen Arbeiten, die ein Verschwinden von Ag-spezifischen T-Effektorzellen aus der Zirkulation und die Ansammlung in Antigen enthaltenden Organen zeigen[78, 79, 98-100]. Dies unterstützend wurde eine Ansammlung von Autoantigen-spezifischen T-Effektorzellen in Organen mit Autoantigenexpression nachgewiesen[84, 101-103]. Weiterhin gelang der Nachweis einer Ansammlung Ag-spezifischer T-Effektorzellen in der Lunge im Verlauf einer experimentellen Influenza-Infektion[87] und in einer Ag-spezifischen Hautinflammationsreaktion[88]. Auf molekularer Ebene wird für das Ag-spezifische Migrations-

muster von T-Effektorzellen die Interaktion des TCR mit spezifischem Antigen auf MHC-II-Molekülen postuliert. Diese Interaktion soll zur differentiellen Regulation von z. B. Adhäsionsmolekülen betragen, die so eine Ag-spezifische Lokalisation vermitteln. Die Interaktion des TCR mit Antigen beladenen MHC-II-Komplexen ist niedrigaffin, so dass sie wahrscheinlich keine direkte Rolle in der T-Zell-Adhäsion spielt. Hingegen ist die sekundäre Induktion von Adhäsionsmechanismen wahrscheinlicher[104]. Möglicherweise vermitteln proinflammatorische Effektorzytokine, wie $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IFN}\gamma$, diese sekundären Effekte und führen durch eine selektive Aktivierung zur Retention von Ag-spezifischen T-Effektorzellen.

Arbeiten, die In-vivo mit TCR^{tg} -T-Helferzellen die Migration Ag-spezifischer T-Effektorzellen untersuchten, zeigten ein mehrphasiges Interaktionsmuster von T-Zellen mit Ag-präsentierenden Zellen, das initial durch eine serielle, kurzlebige Interaktion von Ag-spezifischen naiven Th-Zellen mit APCs gekennzeichnet ist. In der zweiten Phase der Inflammation, nach mehreren Stunden, kam es zu einer stabilen Bindung, die durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet war und in die dritte Phase hochgradiger Motilität und Proliferation überging[99]. Hieraus lässt sich jedoch für Effektorzellen sowohl eine Ag-spezifische als auch eine unspezifische Retention ableiten. Andere Arbeiten unterstützen die Annahme von Ag-spezifischen, lang anhaltenden Bindungen von dendritischen Zellen und Ag-spezifischen T-Zellen[105]. In einem Inflammationsmodell des ZNS, der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE), die – ähnlich der T-Zell-abhängigen Immunantwort vom verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity, DTH) – eine T-Zell-abhängige Inflammationsreaktion ist, zeigt sich eine MHC-II-abhängige Migrationsverlangsamung Ag-spezifischer T-Effektorzellen. Hier wurde erstmals auch eine Kontrolle mittels aktivierter T-Helferzellen mit irrelevanter Spezifität untersucht[106], die ohne Verlangsamung durch das Gewebe wandern. Ob diese Ag-spezifische Verlangsamung durch die Interaktion von APC mit Ag-spezifischen T-Effektorzellen bedingt ist, wurde jedoch nicht direkt gezeigt. Die genaueren molekularen Mechanismen dieser Interaktion, insbesondere notwendige Co-Rezeptoren und die Regulation dieser spezifischen Interaktion, sind bisher unzureichend charakterisiert worden. Insbesondere die Integrine αL und α4 scheinen hierbei keine Rolle zu spielen. Dies ist insofern überraschend, da diese Integrine in der APC:T-Helferzell-Interaktion und in der Bindung von Leukozyten an extrazelluläre Strukturen beteiligt sind[83, 107].

Gegen ein Ag-spezifisches Trapping sprechen Befunde, die zeigen, dass Ag-spezifische CD4^+ - und CD8^+ -Gedächtniszellen in einer Reihe nicht-lymphoider Organe, die kein Antigen enthalten, nachweisbar sind[39, 108-111]. Für CD8^+ -T-Zellen, die jedoch möglicherweise einer ande-

ren Regulation als CD4⁺-Zellen unterworfen sind, konnte in einem Tumorantigen-spezifischen Modell eine Ag-unabhängige Infiltration in Tumore gezeigt werden[112]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass naive Th-Zellen, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen Interaktionen mit APCs in lymphoiden Organen in gleicher Frequenz und Dauer unabhängig von der Ag-Spezifität eingehen[100]. Ein weiterer Mechanismus der Anreicherung Ag-spezifischer Effektorzellen ist eine Ag-spezifische Proliferation am Inflammationsort. Die bisher durchgeführten Studien konnten zwar eine proliferierte Population von T-Effektorzellen am Inflammationsort nachweisen; ob dies durch lokale Proliferation oder selektive Migration proliferierter Zellen verursacht war, ließ sich jedoch nicht klären[88]. Die Konsequenzen der lokalen APC:TCR-Interaktion für die Lokalisation oder Proliferation Ag-spezifischer T-Effektorzellen sind somit nicht abschließend untersucht.

3. Einfluss von Antigen auf den lymphozytären Egress

Die Regulation des Egresses von T-Effektorzellen ist bisher wenig untersucht. Bekannt ist, dass CCR7- und S1P1-Rezeptoren insbesondere in Lymphknoten für die Emigration aktivierter T-Effektorzellen von Bedeutung sind[113, 114]. Unklar ist jedoch, ob eine Ag-abhängige Aktivierung direkten Einfluss auf den Egress hat.

Somit existieren direkte und indirekte Mechanismen, die einen Einfluss von lokalem Antigen auf die Lokalisation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen wahrscheinlich machen. Die beobachtete Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen in Entzündungsreaktionen ist das Resultat von Ag-spezifischer Migration, Ag-spezifischem Trapping, verändertem Egress Ag-spezifischer Zellen und lokaler Proliferation Ag-spezifischer Zellen. Durch die bisher durchgeführten Experimente lässt sich nicht zwischen dem Verhalten von Ag-spezifischen und polyklonalen T-Effektorzellen unterscheiden und die Rolle von Antigen auf die Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen im inflammatorischen Kontext in nicht-lymphoiden Organen ist somit nicht klar.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion von Ag-spezifischen T-Effektorzellen in der Entwicklung einer Inflammationsreaktion und der Funktion von lokalem Antigen für eine präferentielle Akkumulation Ag-spezifischer T-Effektorzellen.

Die Rolle von Antigen in der Auslösung und Steuerung der Immunantwort wird derzeit nach folgendem Paradigma beschrieben: In primären Immunreaktionen werden APCs durch unspezifi-

sche Reize bei Gewebsuntergang und durch unspezifische Abwehrmechanismen aktiviert, prozessieren Antigen und präsentieren dies auf MHC-II-Molekülen. In Folge der Aktivierung wandern die APCs in den Lymphknoten aus. Hier kommt es zur Interaktion mit naiven Th-Zellen, die durch lymphoide Gewebe rezirkulieren und nach Ag-Erkennung aktiviert werden, proliferieren und differenzieren. Die entstandenen Effektor-/Gedächtnis-Zellen (z. B. Th1-Zellen) verlassen den Lymphknoten über die efferente Lymphe, gelangen über den ductus thoracicus in den Blutstrom und werden im gesamten Körper verteilt. Unter homöostatischen Bedingungen wandern diese Zellen in periphere Gewebe ein. Erfolgt dort keine Ag-Erkennung, wandern diese Zellen in die lokalen Lymphknoten(LN) und verlassen diese wieder über die efferente Lymphe um letztlich wieder über den Blutstrom erneut zu rezirkulieren. Besteht eine Entzündung im peripheren Gewebe, kommt es zur verstärkten Extravasation von T-Effektorzellen in das Gewebe. Erkennen spezifische T-Effektorzellen ihr spezifisches Ag, führt dies zur Aktivierung der Effektorfunktionen und einer Verstärkung der Inflammation. Im Rahmen der sich entfaltenden Entzündungsreaktion wird wiederum Antigen in die drainierenden Lymphknoten transportiert und an naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen präsentiert, die in der Folge aktiviert werden und proliferieren. Am Inflammationsort wird dann eine starke Ansammlung Ag-spezifischer T-Effektorzellen beobachtet.

Die Rolle von Antigen für diese Akkumulation von Ag-spezifischen Effektorzellen im Entzündungsgewebe im Verlauf einer akuten Entzündung ist jedoch unklar. Nach der zu untersuchenden Hypothese, die sich aus der Modellvorstellung des Ag-spezifischen „Trappings“ ableitet, werden Ag-spezifische T-Effektorzellen in der Entzündungsreaktion durch Ag-Präsentation in nicht-lymphoiden Geweben selektiv zurückgehalten. In der Folge akkumulieren Ag-spezifische T-Effektorzellen über die Zeit und verstärken die Entzündungsreaktion. Alternativ kann die Migration der T-Effektorzellen vollständig unabhängig von der Ag-Spezifität sein, und die Migration aktivierter T-Effektorzellen in eine Inflammationsreaktion wäre alleinig abhängig vom Aktivierungsstatus. Möglicherweise verändert sich auch die Migrationskapazität zu unterschiedlichen Phasen der Inflammationsreaktion, so dass unterschiedliche Mechanismen zur Ansammlung Ag-spezifischer T-Effektorzellen in Inflammationsreaktionen führen.

Untersucht werden sollten daher die folgenden Fragen:

- Welche Rolle haben Ag-spezifische T-Effektorzellen für das Auslösen der Inflammationsantwort?

- Ist die Migration Ag-spezifischer T-Effektorzellen im Gegensatz zu polyklonalen Zellen in eine akute Inflammationsantwort spezifisch?
- Akkumulieren Ag-spezifische T-Effektorzellen in der akuten Inflammationsreaktion?
- Unterscheidet sich das T-Effektorzell-Infiltrat in frühen von dem in späten Zeitpunkten?
- Welche Rolle spielen sekundäre Aktivierungsmechanismen wie das proinflammatorische Zytokin $\text{TNF}\alpha$ für die Migration von T-Effektorzellen?

2 Material

2.1 Medien und Lösungen

Komplett-Medium	RPMI 1640 mit Glutamax-I (incl. 25mM HEPES, 10 % fetales Kälberserum, 50 μM Mercaptoethanol, 1mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin)
PBS einfach	NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, 1,4 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Waschmedium	PBS, einfach, Rinderserumalbumin (BSA) 2 g/l
Saponin-Puffer	PBS, BSA 2 g/l, Saponin 5 g/l, NaN_3 15mM
Fixierungslösung	PBS, Paraformaldehyd (PFA) 10 g/l, pH 7
Erythrozyten-Lyse-Puffer	KHCO_3 10mM, NH_4Cl 155 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5
Nycodenz-Lösung	Nycodenz 17g, RPMI 1640 26ml, FCS 10ml, ad 100ml mit H_2O dest

2.2 Zusätze zur Zellkultur

Rekombinante Zytokine

rek. murines Il-2	R+D Systems (Wiesbaden)
rek. murines Il-12	R+D Systems (Wiesbaden)
rek. murines IFN- γ	R+D Systems (Wiesbaden)

Ovalbumin Protein und Peptid

Es wurde Ovalbuminprotein Grade V von Sigma mit einem Molekülgewicht von 44287 verwendet.

Ovalbuminpeptid OVA₃₂₃₋₃₂₉ mit der Sequenz ³²³ ISQAVHAAHAEINEAGR ³²⁹ wurde vom Institut für Biochemie der Humboldt Universität zu Berlin synthetisiert.

2.3 Antikörper

Aufreinigung von CD4+ T Zellen via „Panning“

Spezifität	Klon	Quelle
anti Ratte IgG	polyclonal	DAKO

Panning Mix:

Ratte-anti-Maus CD8	TIB105 (53-6.72)	ATCC
Ratte-anti-Maus Mac-1	M1/70	ATCC
Ratte-anti-Maus CD25	PC6.1	Nabholz, Hartmann
Ratte-anti-Maus B220	RA3-6B2	DAKO
Ratte-anti-Maus FcRII, III	2.4G2	ATCC

Antikörper zur durchflusszytometrischen Färbung

Spezifität	Klon	Kopplung
anti-Maus CD3	145-2C11	PE, FITC
anti-Maus CD4	GK1.5	FITC, CY5, PerCP
anti-Maus OVA-TCRtg	KJ1-26.1	CY5
anti-Maus CD62L	Mel14	FITC, PE
human-P-Sel	Vestweber	unkonjugiert
anti-human P-Sel	Vestweber	PE
anti-Maus IFN γ	XMG1.2	FITC, PE
anti-Maus CD8	53-6.72	FITC, PE
anti-Maus B220	RA3-6B2	FITC, PE
anti-Maus IL-4	11B-11	FITC, PE
Isotypkontrollen		
anti-Maus IgG1	R3-34	FITC, PE
anti-Maus IgG2a	R35-95	FITC, PE
anti-Maus IgG2b	A95-1	FITC, PE

Blockade von TNF α

Hierzu wurde ein lösliches Rezeptorkonstrukt aus zwei p75-Untereinheiten des humanen TNF α -Rezeptors verwendet (Etanercept, Enbrel®). Es wurden 0,4 mg/kg KG appliziert[115]. Zu den gekennzeichneten Zeitpunkten wurde das Rezeptorkonstrukt i. p. injiziert[116, 117].

2.4 Radioisotope zur Zellmarkierung

¹¹¹ Indiumoxin	8-Chinolinol,[¹¹¹ In]Indium(III)-Salz	Amersham Buchler
⁵¹ Chromium	Na- ⁵¹ Chromat	Amersham Buchler

⁵¹Cr ist ein γ -Strahler und gibt Elektronen im Bereich von 250 bis 350 keV ab; ein charakteristischer Peak liegt bei 320 keV. Die Halbwertszeit liegt bei 66,7 h.

¹¹¹In ist ein γ -Strahler und gibt Elektronen im Bereich von 320 bis 541 keV ab; ein charakteristischer Peak liegt bei 416 keV. Die Halbwertszeit liegt bei 67,7 h.

2.5 Versuchstiere

Zur Organentnahme wurden weibliche Balb/c, Do11.10 und Do11.10 TCR α k. o.[118, 119] Mäuse verwendet. Die Mausstämme sind haploid (Haplotyp b im H-2).

Die Stämme Do11.10 und Do11.10 TCR α k.o. exprimieren einen monoklonalen T-Zell-Rezeptor, der immunodominant die Sequenz OVA₃₂₃₋₃₂₉ aus Hühneralbumin erkennt. Der Stamm Do11.10 bildet zu ca. 60 % Ag-spezifische T-Zell-Rezeptoren aus, wohingegen der Stamm Do11.10 TCR α k. o. ausschließlich den transgenen T-Zell-Rezeptor exprimiert.

Der TCR setzt sich aus je 2 Untereinheiten zusammen, die auf unterschiedlichen T-Zell-Subsets exprimiert werden. Unterschieden werden α/β - und γ/δ -TCR, wobei α/β -TCR-exprimierende T-Zellen hauptsächlich zur adaptiven Immunantwort beitragen. T-Zellen von Do11.10-Tieren exprimieren T-Zellen mit je 2 unterschiedlichen TCR. Durch die endogene α -Kette wird der endogene α/β -TCR und durch die transgene α -Kette der transgene α/β -TCR gebildet[118]. In DO11.10 TCR α k. o. ist die α Kette deletiert, so dass der endogene T-Zell-Rezeptor nicht mehr zusammengesetzt werden kann, und die T-Zellen exprimieren ausschließlich einen funktionellen transgenen α/β -TCR. Für In-vivo-Homing-Versuche wurden Balb/c als Empfängertiere verwendet. Die Tiere waren acht bis zwölf Wochen alt. Die Zuchthaltung wurde im Institut für Risikobewertung Berlin unter SPF-Bedingungen durchgeführt. Die Versuche wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung G0028/97 (Prof. Hamann) durchgeführt.

3 Methoden

3.1 Lymphozytenisolation aus der Maus

Zur Gewinnung der Lymphozyten wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und anschließend erfolgte die Entnahme von peripheren und mesenterischen Lymphknoten und der Milz. Nach mechanischer Zellvereinzelnung aus dem Gewebsverband wurden vitale monozytäre Zellen durch Gradientenzentrifugation gewonnen und entsprechend der Zielpopulation aufgereinigt und kultiviert. Alle Zellkulturisolationsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in Laminar-Flow-Arbeitsplätzen durchgeführt.

3.2 In-vitro-Generierung von CD4⁺-Effektorzellen (Th1-Kultur)

Ziel der Arbeit war, das Verhalten von CD4⁺-T-Effektorzellen zu verfolgen. Hierzu wurden naive CD4⁺-T-Zellen isoliert und polyklonal mit Antikörpern In-vitro stimuliert und unter Zytokineinfluss zu T-Effektorzellen (Th1) polarisiert.

Aufreinigung von naiven (CD62L high) CD4-Zellen

Zunächst wurden Lymphknoten, die den höchsten Anteil an naiven CD4⁺-Zellen enthalten, aus gesunden Wildtyp(wt)- und OVA-TCR^{tg}-Tieren isoliert. Monozytäre Zellen aus lymphatischen Organen wurden nach mechanischer Organzerkleinerung mittels Dichtezentrifugation für 10 min. bei 2.000 g über Nycodenz aufgereinigt. Die gereinigten Zellen wurden in einer Petrischale ausgesät, welche über Nacht mit Kaninchen-anti-Maus-Antikörpern (50 µg/ml, DAKO) beschichtet wurde und vor Einsatz 5-mal mit PBS gewaschen wurde. Dieser Schritt isoliert unspezifisch bindende Zellen, insbesondere B-Zellen. Nach 20 min. wurden die nicht adhärenen Zellen durch vorsichtiges Spülen abgenommen und bei $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml im Panning-Mix resuspendiert. Nach 20 min. Inkubation auf Eis und 2-maligem Waschen wurden die Zellen in Folge auf 2 anti-Maus-Ig-Ak-beschichtete Petrischalen ausgesät und nach 20 min. Inkubation durch vorsichtiges Spülen gewonnen. Bei dieser Technik sind mehrere Interaktionen der zu depletierenden Zellen mit der mit Immunglobulin beschichteten Oberfläche möglich. Fc-Rezeptor-tragende Zellen (Makrophagen, B-Zellen) können über eine Bindung des Fc-Fragments des Ratte-anti-Maus-Ak adhären, die durch die Panning-Mix-Ak markierten Zellen werden durch die anti-Fab-Fragmente der Ratte anti-Maus-Ak gebunden.

Durch die Negativdepletion ließ sich eine 94- bis 98%ige Reinheit von CD4⁺-Zellen erzielen. Im Anschluss erfolgte eine Positivselektion auf CD62L (L-Selektin), ein Marker für naive Th-

Zellen, mittels Magnet-aktivierter Zellsortierung (MACS®). Hierbei wurden Antikörper verwendet, die mit paramagnetischen Metallpartikeln (MACS® beads) gekoppelt waren. Nach Markierung der Zielpopulation ließ sich eine Positivselektion durch selektive Adhäsion im magnetischen Feld in einer Säule aus Stahlwolle durchführen. Nach Entfernung des magnetischen Felds konnten die Zellen mobilisiert und in Kultur genommen werden. Insgesamt ließ sich eine Reinheit von CD4⁺ CD62L⁺-Zellen von 94-98 % erzielen (Abbildung 1).

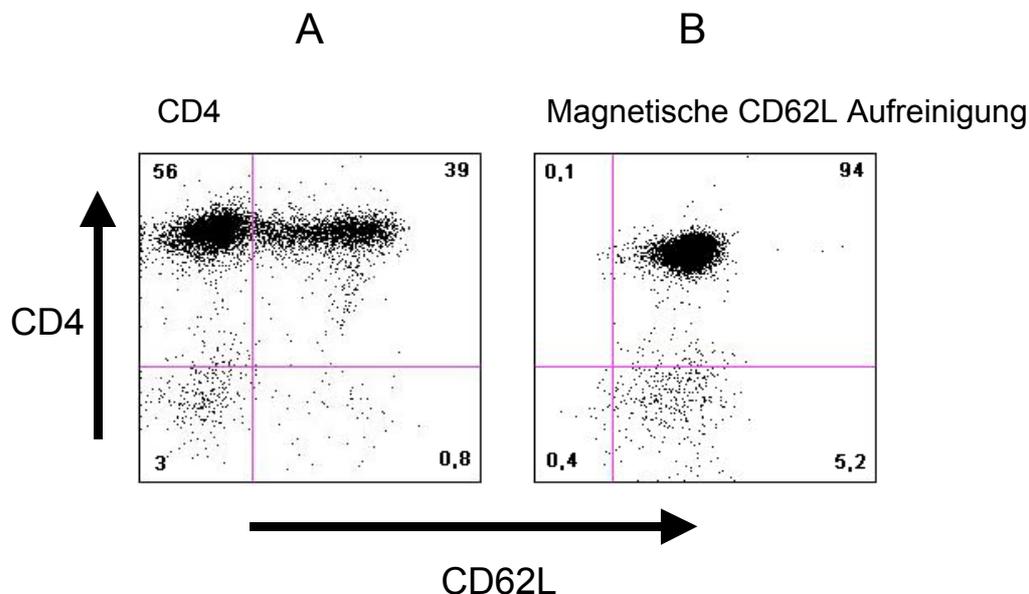


Abbildung 1: Aufreinigung von naiven CD4-Zellen

Immunphänotypisierung der angereicherten Zellfraktionen A nach Negativdepletion für CD4 (Panning) und B nach magnetaktivierter Zellsortierung für CD62L (L-Selektin). In den Quadranten wird die prozentuale Verteilung der Zellen angegeben.

Th1-Polarisierung von naiven T-Helferzellen

Die aufgereinigten Zellen wurden polyklonal für 2 Tage stimuliert mit plattengebundenen anti-CD3(3 ug/ml)- und anti-CD28(5 ug/ml)-Antikörpern in c-RPMI 1640 angereichert mit löslichem anti-IL4 (5 ug/ml), IFN γ (20 ng/ml) und IL-12 (5 ng/ml). Nach 2 Tagen erfolgte die Umsetzung auf unbeschichtete Petrischalen, und an Tag 5, nach Abschluss der Proliferationsphase, wurden die Zellen in den Experimenten eingesetzt[12].

Phänotypisierung von Th1-Kulturen

An Tag 5 wurden die gewonnenen Kulturen zur Vergleichbarkeit vor dem Einsatz phänotypisiert. Nach unspezifischer Stimulation mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) für 4 h und BrefA (10 ug/ml) für die letzten 2 h wurde die Ag-Spezifität mit klonotypischem Ak gegen den transgenen TCR, die P-Selektinligandenexpression, als Ausdruck der inflammatorischen

Migrationskapazität und die Produktion von IFN γ , als Ausdruck der Th1-Effektorzell-Differenzierung, gemessen (s. u.).

Markierung von Lymphozyten

Radioaktivmarkierung

Radioaktive Strahlung und die verwendeten Trägersubstanzen sind für lebende Zellen toxisch. Zur Minimierung von toxischen Effekten wurden Markierungsprotokolle verwendet, die als neutral auf die Zellmigration beschrieben sind (s. u.). Lymphozyten wurden zur In-vivo-Detektion mit zwei unterschiedlichen Radioisotopen markiert. Die Markierung erfolgte mit ^{51}Cr Chromium (^{51}Cr) und ^{111}In Indium (^{111}In). Zur Chrommarkierung wurden die Zellen mit 20 μCi ^{51}Cr bei $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml für 60 min. bei 36 °C in c-RPMI inkubiert und danach einmal gewaschen. Die ^{111}In -Markierung erfolgte mit 1 μCi ^{111}In bei $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml. Hierzu wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und bei $1 \cdot 10^7$ Zellen/100 μl mit 1 μCi ^{111}In für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss einmal mit c-RPMI gewaschen. Nach radioaktiver Markierung wurden die Lymphozyten 2 h bei 36 °C inkubiert. Vor adoptivem Transfer wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Nycodenz (17,1% isotonische Lösung) durchgeführt, um durch die Markierungsprozedur geschädigte Zellen zu entfernen.

Radiodetektion

Die Messung der Radioaktivität wurde in einem automatischen γ -Zähler vorgenommen (Wallac 1480 WIZARD). Bei simultaner Messung von ^{51}Cr und ^{111}In wurde eine Spillover-Korrektur durch Bestimmung des Korrektionskoeffizienten und bei kurzer Halbwertszeit des ^{111}In eine Korrektur für den radioaktiven Zerfall während der Messung sowie eine Korrektur der Hintergrundstrahlung durchgeführt. Vor Messung wurde die korrekte Lage der radioisotopspezifischen Detektionsfenster nach automatischer Kalibrierung überprüft. Die Markierungsprozeduren waren auf eine maximale Aktivität der Proben auf $2 \cdot 10^6$ cpm eingestellt, da die Messung höherer Aktivitäten im verwendeten Gerät nicht möglich war.

Durchflusszytometrie (FACS)

Die Phänotypisierung der Lymphozyten wurde durch Messung der Fluoreszenzeigenschaften nach Markierung der Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern im Durchflusszytometer (Calibur und LSRII, BD Biosystems) durchgeführt. Hier lässt sich sowohl die Expression von Oberflächen- als auch von intrazellulären Proteinen auf Einzelzellebene bestimmen. Die verwendeten Geräte erlauben die Analyse von bis zu 20.000 Zellen/ Sekunde, so dass auch über

kleine Zellpopulationen eine genaue Aussage getroffen werden kann. Die fluoreszenz markierten Zellen passieren im hydrodynamisch fokussierten Einzelzellstrahl nacheinander zwei Laserstrahlen, einen 488 nm Argonlaser und einen 635 nm Diodenlaser. Sowohl die simultane Lichtemission der angeregten Fluorochrome, als auch Streulichtphänomene einer einzelnen Zelle werden dann nach optischer Auftrennung verschiedener Wellenlängen durch Bandpassfilter mittels Photoverstärkern gemessen. Es können dann Aussagen über die physikalischen Zelleigenschaften, die mit Größe und Granularität korrelieren und anhand der Fluoreszenzeigenschaften, Aussagen über die Proteinexpression gemacht werden. Zur Auswertung wurde die Software „Cellquest“ von BD benutzt. Zelltrümmer und tote Zellen wurden durch Größenanalyse und tote Zellen bei Messung von unfixierten Zellen durch Anfärbung mit Propidiumiodid (PI) ausgeschlossen.

Fluoreszenzmarkierung

Für die FACS Analyse wurden Lymphozyten mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern in 100ul FACS Puffer für 15min. inkubiert, einmal gewaschen und dann analysiert.

Zur Verfolgung von Lymphozyten In-vivo wurden T-Effektorzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff intrazellulär gefärbt. Hierzu wurden In-vitro generierte Zellen mit 5-(and 6-)Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFSE; Molecular Probes; 5 µmol) für 2 min. und 40 sec. in PBS suspendiert. CFSE interagiert mit intrazellulären Proteinen und bildet eine kovalente Esterbindung mit diesen aus. Die CFSE Markierung lässt sich im Durchflusszytometer messen und so lassen sich markierte Zellen über einen langen Zeitraum In-vivo und In-vitro nachweisen. Die Zellen wurden gewaschen und für 2 h in frischem Medium inkubiert. Tote Zellen wurden vor Transfer über Gradientenzentrifugation mittels Nycodenz (17,1 % isotonische Lösung) entfernt[120].

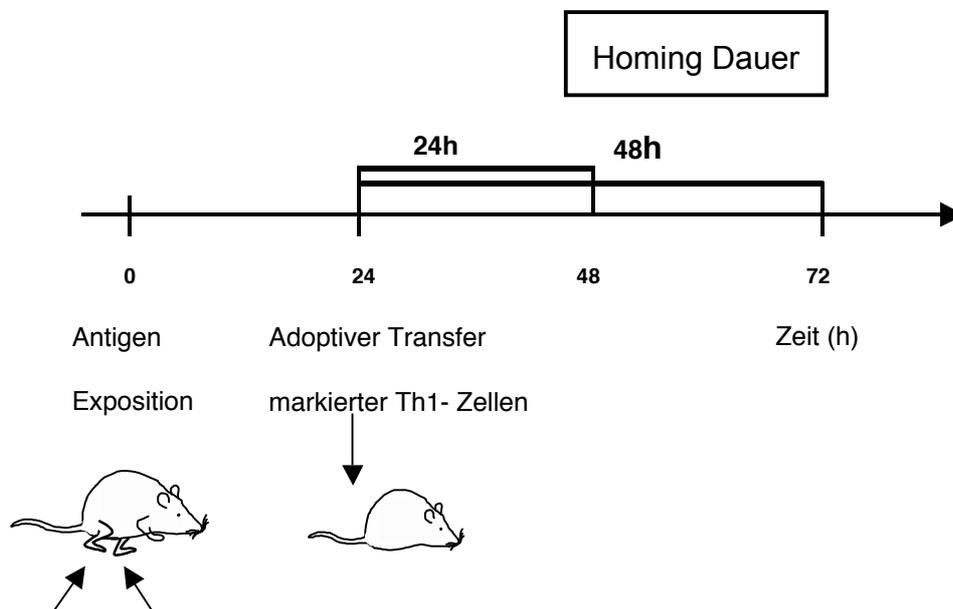
3.3 In-vivo-Entzündungsmodell in der Haut

Um die Migrationseigenschaften der T-Effektorzellen zu untersuchen, wurden in der Arbeit experimentelle Modelle einer kutanen Inflammation verwendet. Diese Reaktion ist eine T-zellabhängige Inflammationsreaktion (Typ IV Reaktion, delayed-type hypersensitivity (DTH)), die hauptsächlich durch eine lokale Reaktivierung von T-Effektorzellen ausgelöst wird und zytotoxische T-Zellen (CD8+), Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen rekrutiert. Sie steht im Gegensatz zu den Antikörper-vermittelten Immunreaktionen vom „Sofort-Typ“.

Es wurden zwei Modelle verwendet, auf einige Mechanismen soll hier kurz eingegangen werden.

Unspezifische Inflammation mit Antigen

Begonnen wurden die Arbeiten mit einem Modell, in dem lokal eine Entzündungsreaktion durch komplettes Freundsches Adjuvans (CFA) mit Antigen ausgelöst wurde. CFA ist ein starkes Irritans, bestehend aus einer Öl-Emulsion mit Teilbestandteilen von Tuberkelbakterien. Als Antigen in dieser Reaktion wurde Ovalbumin, das spezifische Antigen für OVA-spezifische T-Zellen, oder Rinderserumalbumin als Kontrollantigen (BSA) eingesetzt. Vor Immunisierung/Auslösen der Inflammation wurden Balb/c-Mäuse je rechts und links an der Hinterflanke rasiert. Die Inflammationsreaktion wurde mittels s.c. Injektion von 100 μ l einer Emulsion aus CFA und PBS mit 100 μ g OVA-Protein oder 100 μ g BSA (Kontrolle) durchgeführt. Im Verlauf von 24 h Stunden entwickelte sich eine akute Inflammationsreaktion, charakterisiert durch lokale Hautrötung und Schwellung (Abbildung 2). Es wurde dann die Akkumulation von Ag-spezifischen (OVA^{tg}) und Ag-unspezifischen T-Effektorzellen In-vivo untersucht. Hierzu wurde die Migration von T-Effektorzellen in die behandelte Haut, die



BSA/ CFA s.c. OVA **Protein**/ CFA s.c.

drainierenden Lymphknoten, mesenterielle Lymphknoten, Milz, Leber, Lunge und peripheres Blut (500ul) analysiert.

Abbildung 2:

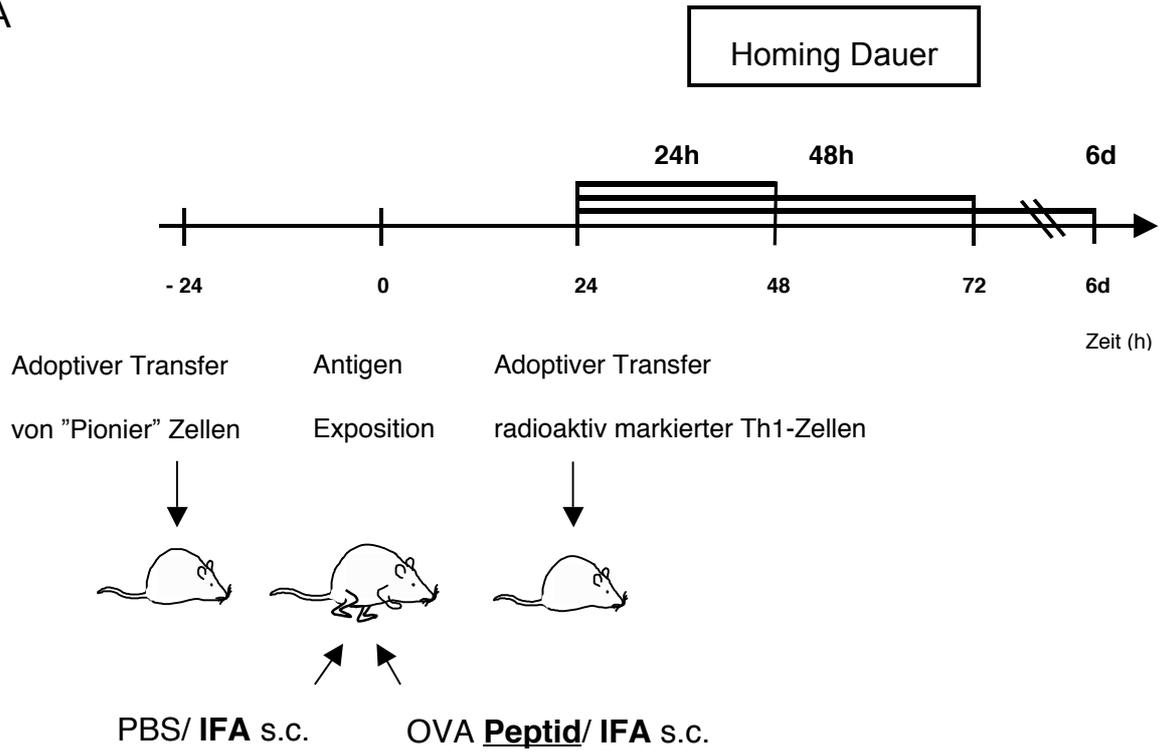
Eine kutane Hypersensitivitätsreaktion wurde durch lokale Ag-Deposition oder Kontrollpeptid-Deposition in Verbindung mit einem unspezifischen Inflammationsreiz (CFA) ausgelöst. Markierte OVA^{tg}- und wt-Th1-Zellen wurden 24 h später durch i.v. Injektion adoptiv transferiert und der Verlauf der Inflammation und die Migration der transferierten Zellen verfolgt.

Pionierzellvermittelte DTH

Zur genaueren Untersuchung der Ag-spezifischen Inflammation wurde das Modell modifiziert. Insbesondere zur Trennung der Effektor- von der Auslösephase der Immunreaktion, die im obigen Modell simultan erfolgte, wurde eine DTH durch Transfer von Ag-spezifischen T-Effektorzellen, im Folgenden als Pionierzellen bezeichnet, und lokale Applikation von Antigen ausgelöst und erst nach Entwicklung der Immunreaktion wurden Indikatorzellen appliziert (Abbildung 3a). Um die lokale Reaktion zu verstärken, die durch Aktivierung weniger in das Gewebe migrierter Ag-spezifischer Pionierzellen ausgelöst wird [39, 52, 121], wurde OVA-Peptid anstelle von Ovalbumin (Protein) verwendet. Lokale APCs sind so in der Lage, schneller und effektiver Antigen zu präsentieren, da eine intrazelluläre Prozessierung entfällt. In der Folge wird eine Lokalreaktion mit maximalem Ödem 24 h nach lokaler Ag-Gabe ausgelöst (Abbildung 3b). Um die Akkumulation von Ag-spezifischen und polyspezifischen T-Effektorzellen in diese Reaktion zu verfolgen, wurden diese nach Markierung adoptiv in Mäuse mit einer etablierten DTH transferiert und die Migration gemessen.

Im Einzelnen wurden in Balb/c-Mäuse $5 \cdot 10^5$ OVA-TCR^{tg} Th1-Effektorzellen (TCR^{tg}) aus In-vitro-Kultur adoptiv durch Schwanzveneninjektion transferiert. Nach 24 h homöostatischer Migration dieser „Pionierzellen“ wurde eine Inflammation durch s.c. Injektion von 5 µl Emulsion aus Inkomplettem Freundschem Adjuvans (IFA) und OVA-Peptid (OVA₃₂₃₋₃₂₉) in die Fußsohle ausgelöst. Die deponierte Antigenmenge betrug ca. 250 ng OVA-Peptid. Im Verlauf von 24 h entwickelte sich eine akute Inflammationsreaktion. Eine Kontrollreaktion wurde mit IFA und PBS am kontralateralen Fuß ausgelöst (Abbildung 3b). Der Verlauf der so ausgelösten Entzündungsreaktion ist charakterisiert durch eine Schwellung mit Maximum 24 h nach Ag-Applikation, die im Verlauf von Tagen langsam abnimmt.

A



B

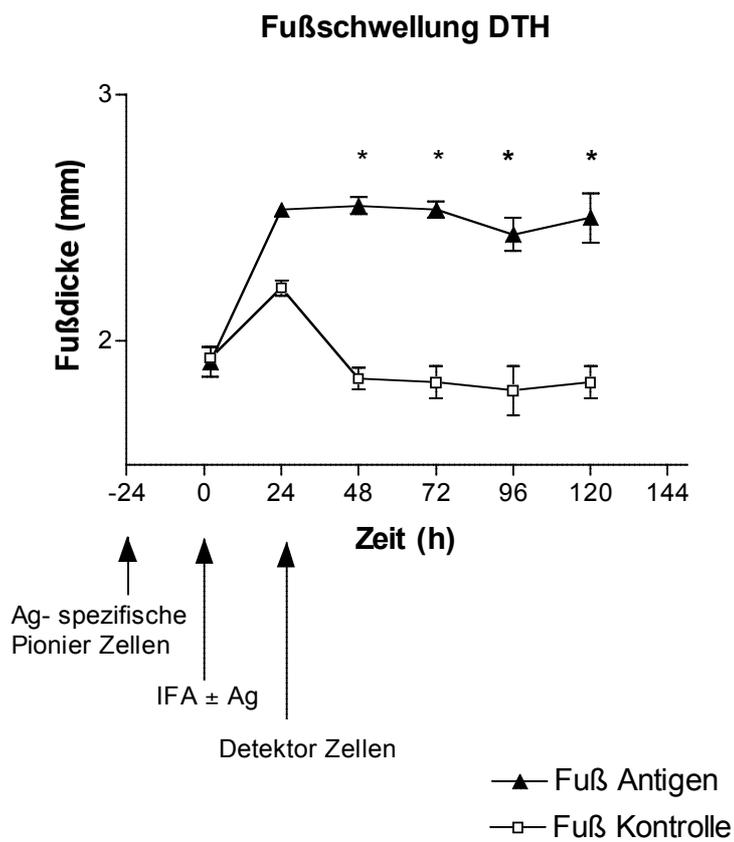


Abbildung 3:

Eine Ag-abhängige Inflammationsreaktion, die verzögerte Hypersensitivitätsreaktion, wurde durch Transfer von OVA¹⁸-Th1-Zellen unter homöostatischen Bedingungen in wt-Empfängertiere und 24 h nach Transfer durch OVA-Peptid-Applikation im Bereich der Fußsohle ausgelöst (Abbildung 3a). Nach weiteren 24 h wurden bei Bestehen der akuten Inflammationsreaktion markierte CD4⁺-Effektorzellen (Th1) transferiert. Die Stärke der Entzündungsreaktion wurde durch Bestimmung der Fußdicke durchgeführt (Abbildung 3b) (0-48 h: n=6; 72-120 h: n = 3, * = p < 0,001, Student T Test).

3.4 Migrationsanalysen (Homing Assays)

Ziel der Arbeit war der standardisierte Vergleich der Migrationseigenschaften von polyklonalen mit Ag-spezifischen T-Effektorzellen. Um vergleichbare Populationen zu erhalten, wurden ex vivo differenzierte T-Effektorzellen generiert und adoptiv transferiert.

Untersuchung des Lymphozytenhomings mittels Radioaktivmarkierung

Die Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert und markiert. Je $1-1,5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in Mäuse mit akuten Inflammationsreaktionen (24 h) mit und ohne Antigen transferiert. Nach 24 oder 48 h wurden die Tiere getötet und die angegebenen Organe isoliert. Eine differentielle Messung der Radioaktivität wurde mit einem γ -Counter (Wallac) durchgeführt. Dafür wurden folgende Organe isoliert: periphere Lymphknoten (cervical, axillär, inguinal), mesenterielle Lymphknoten, Milz, Leber, Darm, Lunge, peripheres Blut (500 μ l), Gewebe der Inflammationsreaktion und der Kontrollreaktion (1 cm^2 Haut der Flankenregion oder der gesamte Fuß) und der Restkörper. Der Anteil der Radioaktivität an der Gesamtaktivität wurde pro Organ bestimmt.

Limitationen der Radioaktivmarkierung

Radioaktive Strahlung, insbesondere die verwendete γ -Strahlung, ist toxisch für lebende Zellen. Insbesondere kommt es durch strahlenvermittelte DNA-Schäden zur Aktivierung von Apoptosemechanismen[122]. Weiterhin sind Zusatzstoffe der Radioisotope zur Stabilisierung und Kopplung für die Zellmarkierung sowie die Zerfallsprodukte toxisch.

⁵¹Cr wird bei Freisetzung schnell renal ausgeschieden, so dass die gemessene Aktivität lebenden Zellen entspricht[123]. ¹¹¹In wird aus apoptotischen Zellen nicht freigesetzt, sondern von ortständigen Zellen aufgenommen[124]. Die Indiumoxin-Markierung ist durch weitere, für die Lymphozytenmarkierung problematische Effekte charakterisiert. Chemotoxische Effekte aus Verunreinigungen der Indiumoxin-Präparation und eine höhere Radiotoxizität bedingen eine genaue Einhaltung der Markierungsprotokolle. Doch lässt sich unter genauer Einhaltung des oben beschriebenen Protokolls eine stabile leukozytäre Markierung erreichen, die für einen Zeitraum von 48 h eine reproduzierbare Messung erlaubt. Wichtig hierfür ist insbesondere hohe

¹¹¹In-Aktivität, Verwendung des Isotops vor der 5. Halbwertszeit zur Minimierung der toxischen Effekte der nicht radioaktiven Kontaminationen in der ¹¹¹In-Oxinchelatlösung, Markierung mit 20 µCi/ml, da höhere Dosen zytotoxisch wirken und geringere Dosen eine oberflächliche, instabile Markierung erzeugen, sowie eine Inkubationsphase von ca. 2 h zum Auswaschen ungebundener Radioaktivität mit anschließender Gradientenzentrifugation zur Abtrennung toter Zellen[122, 125, 126]. Frühere Arbeiten der Gruppe belegten durch dieses Protokoll eine verlässliche Markierung für einen Zeitraum von 48 h[127].

Untersuchung des Lymphozytenhomings mittels Fluoreszenzmarkierung

In vitro generierte Effektorzellen aus Balb/c- und do11.10 TCR α k.o.-Mäusen wurden in einer Ratio von 1:1 gemischt und anschließend mit CFSE (s. o.) markiert. Nach 2 h Inkubation in c-RPMI bei 36 °C wurden tote Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation entfernt (17,1% isotonische Nycodenz, 10 min., 2.000 g). $1-2 \cdot 10^6$ Zellen wurden 24 h nach Auslösen einer DTH transferiert.

Gewebsisolierung von Lymphozyten zur FACS-Analyse

Nach mechanischer Dissektion der Haut der Fußsohle wurde diese enzymatisch in serumfreiem Medium mit 50 µg/ml DNase und 400 U/ml Collagenase bei 36 °C für 60 min. verdaut. Die Verdauung wurde mit kaltem c-RPMI gestoppt und die Zellen nach Oberflächenfärbung mittels FACS untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 In-vitro-Differenzierung Ag-spezifischer und polyklonaler T-Helferzellen

Zur Untersuchung Ag-spezifischer Migration von T-Effektorzellen wurden diese aus Tieren mit monoklonaler Ag-Spezifität (DO11.10/ DO11.10 TCR α k.o.) und wt-Tieren generiert. Der Frage nach unterschiedlichen Migrationseigenschaften der Populationen und somit der Vergleichbarkeit der eingesetzten Zellpopulationen wurde durch die In-vitro-Charakterisierung der wichtigsten Differenzierungs- und Adhäsionsmoleküle für Th1-Zellen nachgegangen. Balb/c- und Do11.10/ DO11.10 TCR α k.o.-T-Zellen zeigten unter den Kulturbedingungen keine signifikanten Unterschiede in Expansionsrate (Abbildung 4b) und Th1-assoziiertem Effektorphänotyp (Abbildung 4a).

Phänotypisch zeigte sich eine Th1-Differenzierung durch den Verlust von CD62L (Daten nicht gezeigt), die Expression von Adhäsionsmolekülen (P-Selektin-Liganden) und im funktionellen Stimulationsassay die intrazelluläre IFN γ -Expression (Abbildung 4a). Eine Th2-Differenzierung konnte durch den Ausschluss einer IL4-Produktion ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die Reinheit der so generierten CD4⁺-Th1-Effektorzell-Population betrug 98 %. Die TCR^{tg}-Zellen (Do11.10 TCR α k.o.) waren zu > 90 % positiv für den transgenen T-Zell-Rezeptor KJ126.1. Die Expression des P-Selektin-Liganden variierte zwischen 20 und 69 % zwischen einzelnen Experimenten, jedoch ohne Unterschied zwischen TCR^{tg} und wt-Zellen im selben Experiment. Die IFN γ -Produktion bewegte sich in bekanntem Ausmaß zwischen 20 und 50 % (Abbildung 4a). Die Unterschiede zwischen Ag-spezifischen und unspezifischen Zellen waren nicht signifikant für die getesteten phänotypischen Merkmale.

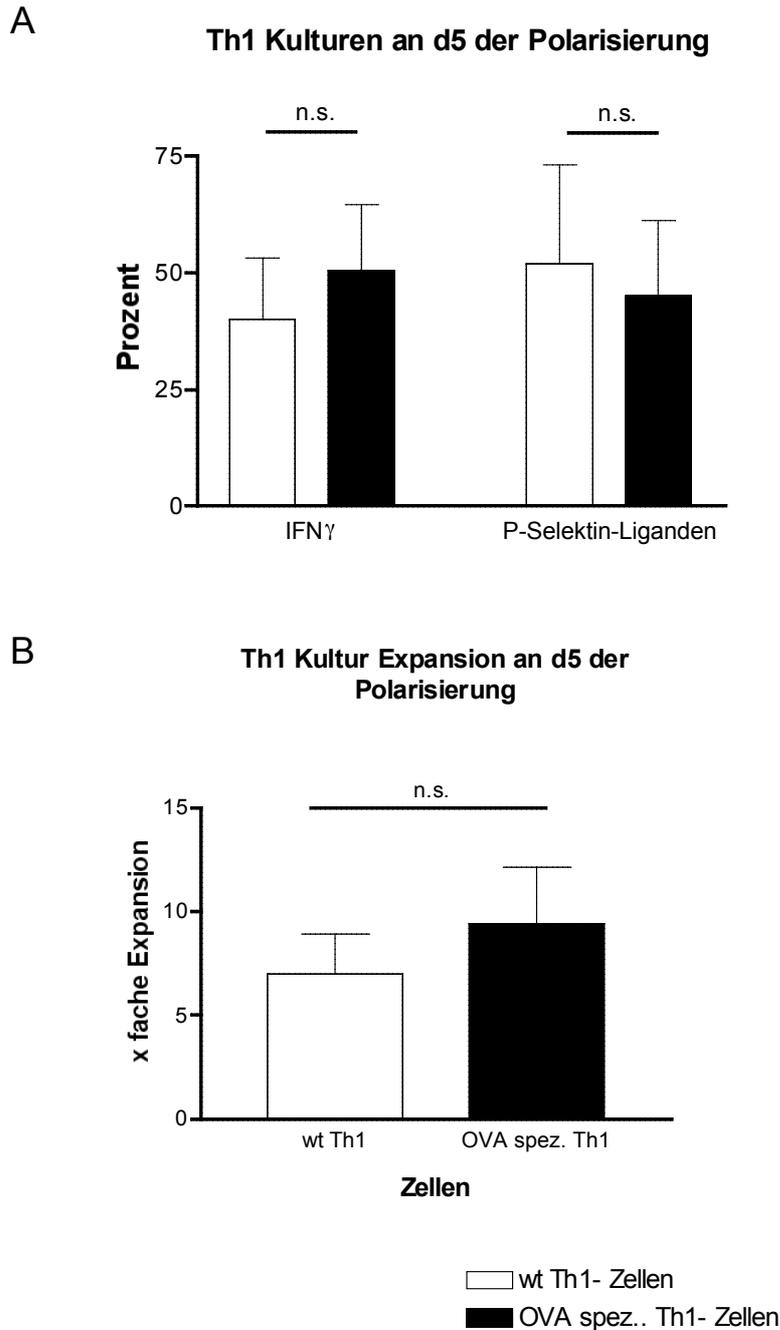


Abbildung 4:

Th1-Kulturen wurden nach 5 Tagen unter Th1 konditionierenden Bedingungen (plattengebundenes anti-CD3, anti-CD28, lösliches IL12, IFN γ , anti-IL4) vor Einsatz im Migrationsassay phänotypisiert. Nach unspezifischer Stimulation mit Phorbolestern und Ionomycin wurde eine kombinierte Oberflächen-(CD4, OVA TCR, P-Selektin-Liganden) und Intrazellulärfärbung (IFN γ) durchgeführt (Abbildung 4a). Abbildung 4b zeigt die Expansionsrate der eingesetzten Zellen nach 5 Tagen (4a: n = 8, 4b: n = 11, Student T Test, p > 0,05).

4.2 Ag führt zur lokalen Anreicherung Ag-spezifischer Th1-Zellen in der akuten Inflammation

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, welchen Effekt spezifisches Antigen am Ort der Entzündung in der Effektorphase auf die Anreicherung von Ag-spezifischen T-Effektorzellen hat. Hierzu wurde simultan eine akute Ag-enthaltende und eine Kontrollentzündungsreaktion in Balb/c-Mäusen ausgelöst (3.3.1 Abbildung 2) und 24 h Stunden nach Auslösung der akuten Inflammation wurden entweder radioaktiv markierte (^{51}Cr) OVA-TCR^{tg}- oder wt-T-Effektorzellen mittels i.v. Injektion in unterschiedliche Tiere transferiert.

In Mäusen, die wt-Zellen erhalten hatten, fand sich keine signifikant unterschiedliche Anreicherung der T-Effektorzellen innerhalb der Entzündungsreaktionen mit Antigen gegenüber der Kontrollreaktion unabhängig von der Präsenz von OVA oder BSA am Ort der Inflammation (Ag oder Kontrollprotein) nach 24 h oder 48 h nach Transfer (Abbildung 5a und b). In Mäusen, die Ag-spezifische Zellen erhalten hatten, akkumulierten CD4⁺-OVA-TCR^{tg}-T-Effektorzellen signifikant stärker innerhalb der Haut, die spezifisches Antigen enthielt, und innerhalb des entsprechenden drainierenden Lymphknotens, verglichen mit der Kontrollinflammation. Die verstärkte Einwanderung der Ag-spezifischen T-Effektorzellen in die Ag-enthaltende Entzündung war geringgradig ausgeprägt, jedoch signifikant unterschiedlich und verstärkte sich im Verlauf von 2 Tagen. Die Verteilung der Ag-spezifischen und unspezifischen Zellen war nicht abhängig von der Verteilung innerhalb anderer Organe (Lunge, Leber, Milz). Ein statistisch signifikanter, jedoch biologisch irrelevanter Unterschied zeigte sich in der Lunge nach 48 h mit verstärktem Nachweis von wt-Th1-Effektorzellen. Aktivierte T-Effektorzellen akkumulieren nach adoptivem Transfer zunächst in der Lunge und wandern danach weiter in Zielgewebe (Abbildung 5c). Eine selektive Retention der wt-T-Effektorzellen in der Lunge ist unwahrscheinlich und die statistische Signifikanz ist am ehesten ein Artefakt durch die Messung sehr geringer Radioaktivität in der Lunge (Abbildung 5c und d). Somit zeigte sich eine Ag-abhängige Lokalisation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen am Ort der Inflammation und dem drainierenden Lymphknoten.

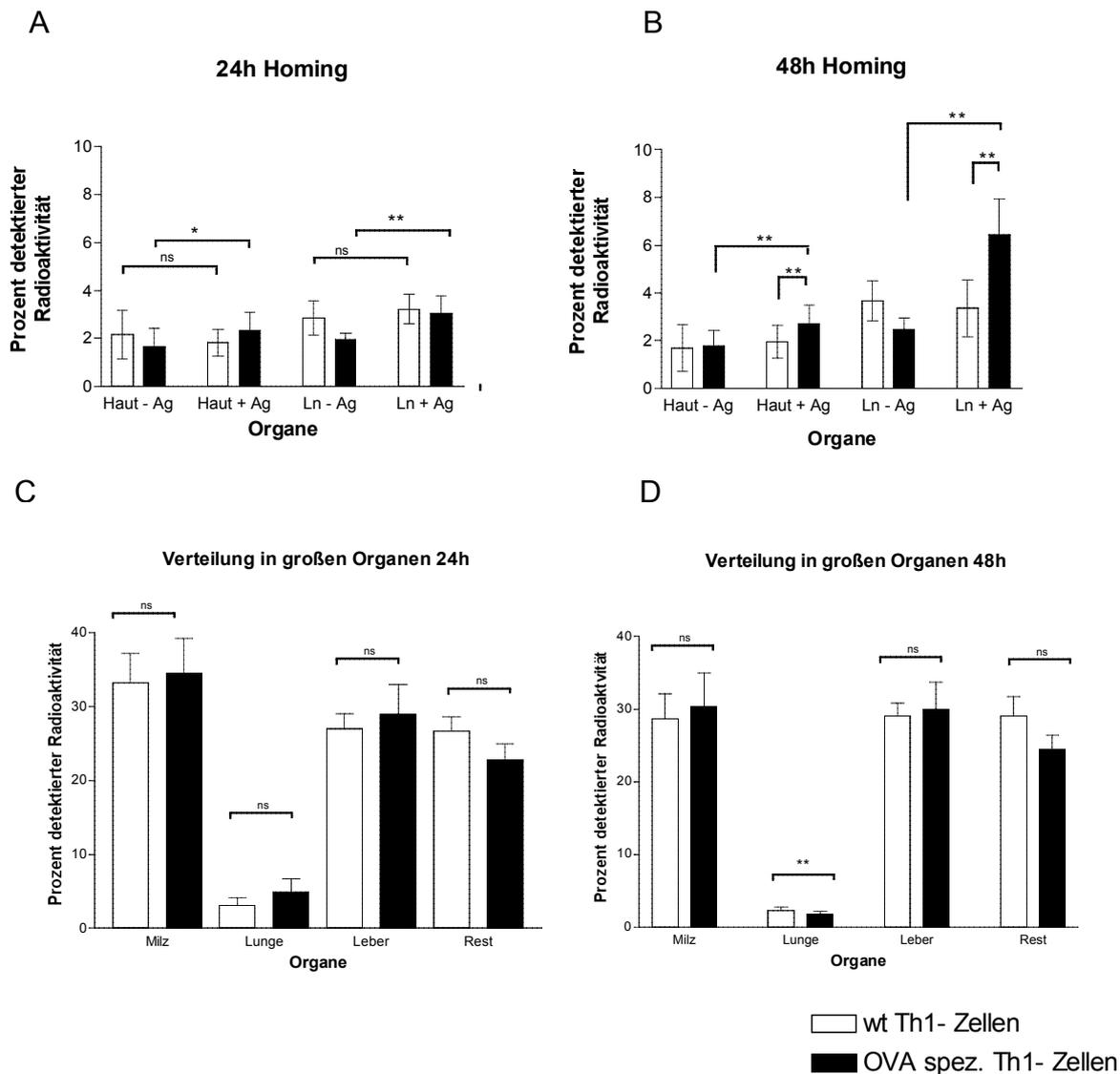


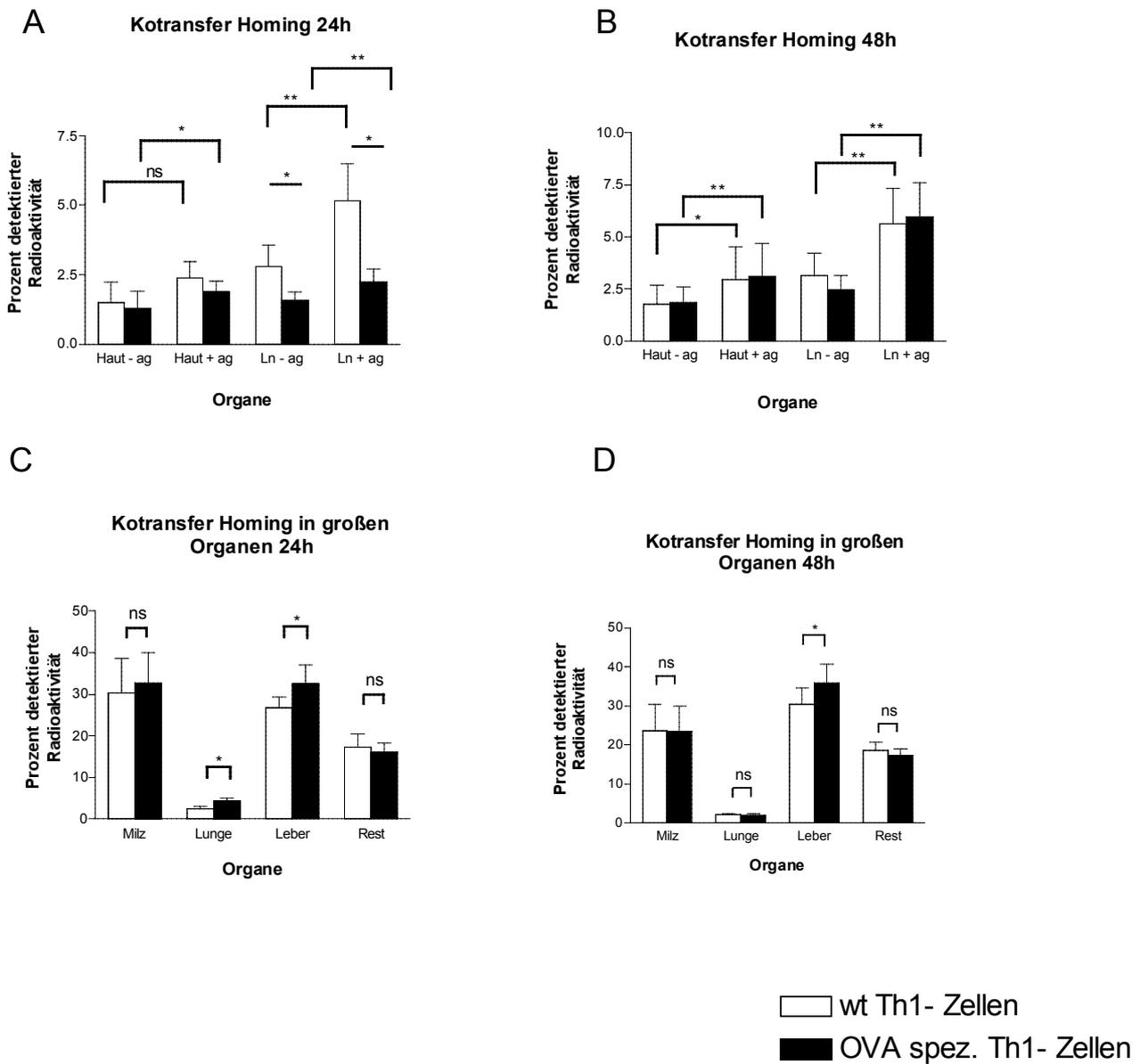
Abbildung 5:

Verteilung von OVA-spezifischen und wt-Th1-Effektorzellen im Verlauf einer akuten Entzündungsreaktion. Die akute Inflamationsantwort wurde durch s.c. Applikation von CFA mit OVA-Protein (spezifisches Ag) oder mit BSA (Kontrollprotein) ausgelöst. 24 h später wurden 51 Chromium-markierte OVA-spezifische Th1- oder wt-Th1-Zellen transferriert. Dargestellt ist die Verteilung der Lymphozyten in der Hautreaktion und den drainierenden Lymphknoten nach 24 h (Abbildung 5a), 48 h (Abbildung 5b) und den großen Organen nach 24 h (Abbildung 5c) und 48 h (Abbildung 5d) ($n = 16$, Test für Vergleich gleicher Zellart an verschiedenen Lokalisationen: Wilcoxon für gepaarte Stichproben, Vergleich unterschiedlicher Zellarten an derselben Lokalisation Mann Whitney U, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$).

4.3 Der Kotransfer von Ag-spezifischen und polyspezifischen T-Effektorzellen führt zur Ansammlung von T-Effektorzellen unabhängig von ihrer Ag-Spezifität

Aus dem Gezeigten ergab sich die Vermutung, dass Ag-spezifische T-Effektorzellen entweder bevorzugt am Ort der Ag-Exposition akkumulieren oder dass die lokale Aktivierung von Ag-spezifischen T-Effektorzellen zu einer Verstärkung der Inflammationsantwort mit erhöhter unspezifischer T-Effektorzell-Akkumulation führt. Eine lokale Proliferation, die mittels Radioaktivität nicht messbar ist, spielt im untersuchten Zeitraum von 48 h wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

Um die Frage zu klären, ob Ag-spezifische T-Effektorzellen lokal akkumulieren oder eine verstärkte Inflammationsantwort vorliegt, wurden Ag-spezifische OVA-TCR^{tg}- und wt-T-Effektorzellen gemeinsam adoptiv transferiert. 24 h vor Transfer wurden die Tiere s.c. nach obigem Modell (3.3.1 Abbildung 2) immunisiert. Die T-Effektorzellen wurden zur Detektion vor Transfer mit unterschiedlichen Radioisotopen (¹¹¹In und ⁵¹Cr) markiert, um eine simultane Messung beider Zellpopulationen im selben Tier zu ermöglichen. Hier zeigte sich eine ähnlich starke Akkumulation von OVA-TCR^{tg}- und wt-T-Effektorzellen innerhalb der Entzündungsreaktion und dem drainierenden Lymphknoten mit Antigen nach 24 h und 48 h (Abbildung 6 a und b), die signifikant für beide T-Effektorzell-Populationen gegenüber der Kontrollentzündung erhöht war. Außerdem zeigte sich eine verstärkte Rekrutierung von polyspezifischen T-Effektorzellen im Lymphknoten gegenüber Ag-spezifischen T-Effektorzellen nach 24 h. Nach 48 h war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Dies spiegelt die Fähigkeit zur unspezifischen Rekrutierung von T-Effektorzellen einer akuten Inflammationsreaktion wider. Dies war überraschend, da Ag-spezifische Mechanismen zur Rekrutierung von T-Effektorzellen existieren, diese In-vivo in der Frühphase jedoch keine selektive Rekrutierung bedingen. Signifikante Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen T-Effektorzellen in großen Organen zeigten sich nicht. In der Kontrollinflammation mit unspezifischem Reiz zeigte sich eine ähnliche, nicht signifikant unterschiedliche Rekrutierung beider Zellpopulationen. In den Kontrollen der großen Organe fiel eine geringe, jedoch signifikante Erhöhung des Ag-spezifischen Signals in der Leber auf (Abbildung 6c und d). Auf dieses Phänomen wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

**Abbildung 6:**

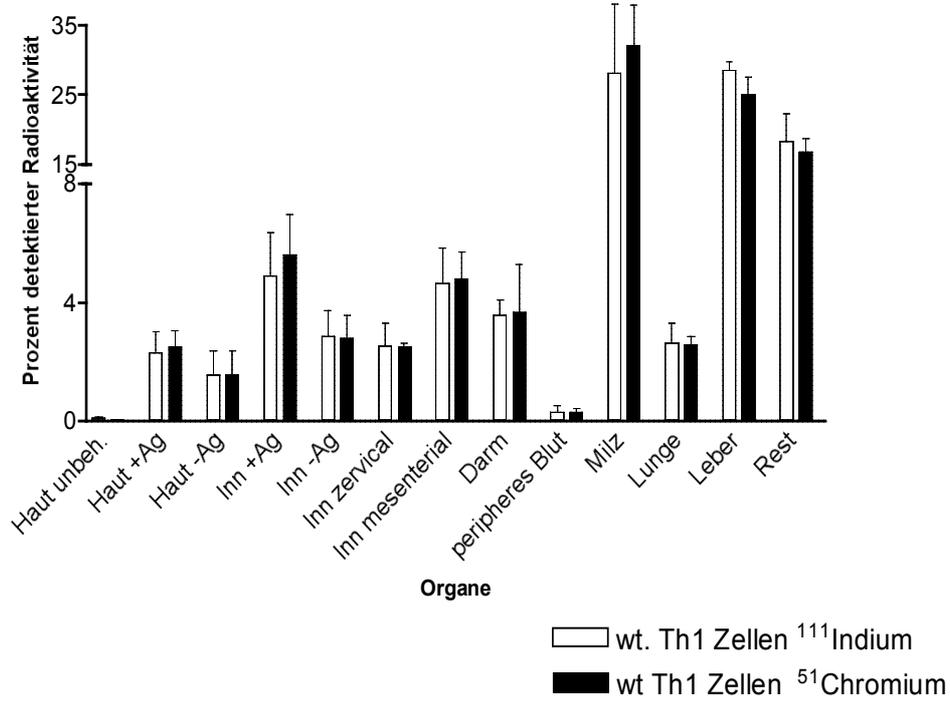
Eine akute Inflamationsreaktion wurde, wie in Abbildung 3, ausgelöst und die Rezipienten erhielten gleichzeitig OVA-spezifische Th1- und wt-Th1-Zellen, die unterschiedlich mit $^{51}\text{Chromium}$ oder $^{111}\text{Indium}$ markiert waren. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der gemessenen Radioaktivität innerhalb der Hautreaktion und der Lymphknoten nach 24 h (Abbildung 6a), 48 h (Abbildung 6b) und der großen Organe nach 24 h (Abbildung 6c) und 48 h (Abbildung 6d) ($n = 12$, Test für Vergleich gleicher Zellart an verschiedenen Lokalisationen: Wilcoxon für gepaarte Stichproben, Vergleich unterschiedlicher Zellarten an derselben Lokalisation Mann Whitney U, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$).

4.4 Der Einfluss der radioaktiven Markierung auf die leukozytäre Migration

Die Radioaktivmarkierung hat durch Strahlung und Chelatorsalze einen Einfluss auf die Zellvitalität. Die Stärke des Einflusses unterscheidet sich zwischen den verwendeten Radioisotopen Indium und Chrom stark. Um diesen radioisotopspezifischen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen in den Homing Assays zu kontrollieren wurden die Experimente zu den Homing-Untersuchungen in zwei Subgruppen durchgeführt. In der einen Subgruppe wurden wt-T-Effektorzellen mit Chrom und Ag-spezifische Do11.10-TCR α -k.o.-T-Effektorzellen mit Indium, in der anderen Subgruppe in umgekehrter Kombination markiert. Mit diesem „Markertausch“ zeigte sich lediglich ein geringer isotopspezifischer Unterschied der Ansammlung Ag-spezifischer Zellen in den Organen Milz und Leber nach 48 h (Abbildung 7d). Beobachtet wurden eine Mehranreicherung von Indium im Vergleich zu Chrom in der Leber und eine Mehranreicherung von Chrom im Vergleich zu Indium in der Milz. Ein ähnlicher Effekt, jedoch nicht signifikant unterschiedlich, zeigte sich in den wt-Zellen (Abbildung 7c). Nach 24 h zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 7 a und b). Diese Unterschiede lassen sich am ehesten auf eine unterschiedliche Messung von apoptotischen Zellen durch die beiden verwendeten Isotope zurückführen. Freies Indium aus apoptotischen Zellen wird von Gewebemakrophagen aufgenommen und verbleibt somit lokal, während Chrom in das Serum abgegeben und renal eliminiert wird. Das verstärkte Indium- und verminderte Chromsignal der Leber kann somit auf eine erhöhte Apoptoserate Ag-spezifischer T-Effektorzellen nach In-vivo-Exposition mit Antigen zurückgeführt werden[128-134]. Die gemessenen Effekte waren jedoch sehr gering, so dass ein sekundärer Effekt auf die Verteilung der Ag-spezifischen T-Effektorzellen auszuschließen ist. Haut und Lymphknoten zeigten über den Zeitraum von 48 h keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Radioaktivmarkierung (Abbildung 7). Die Messung der Zielgewebe Haut und Lymphknoten war somit im Zeitraum von 48 h verlässlich und im Folgenden wurden die radioaktiven Migrationsexperimente mit einer zeitlichen Begrenzung von 48 h ohne „Markertausch“-Markierung durchgeführt[127].

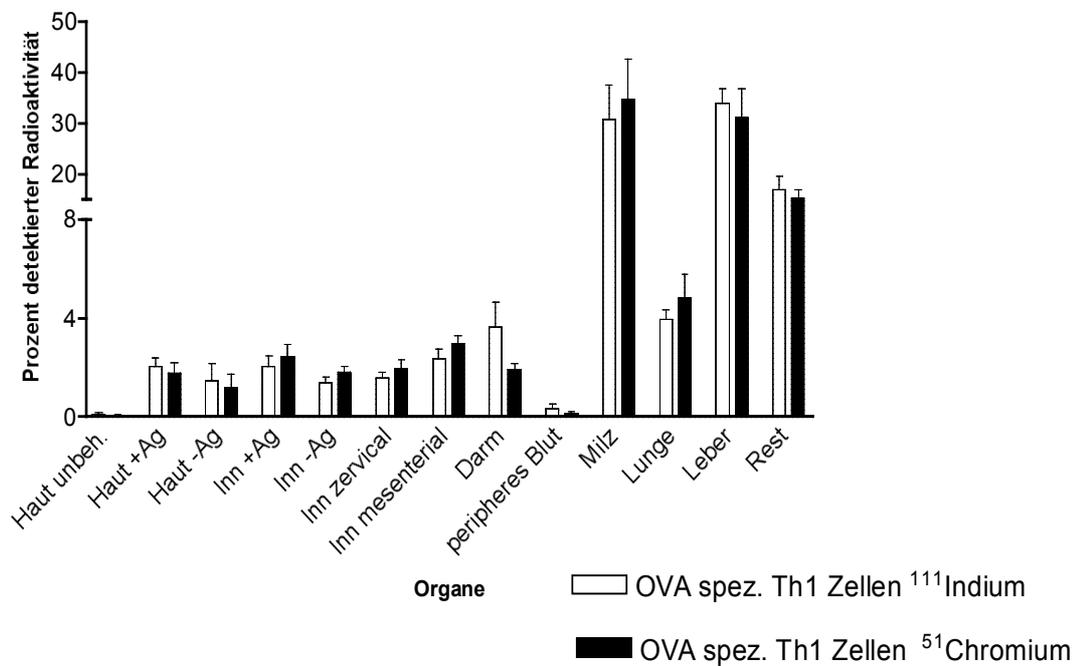
wt Th1- Zellen Isotopvergleich 24h

A

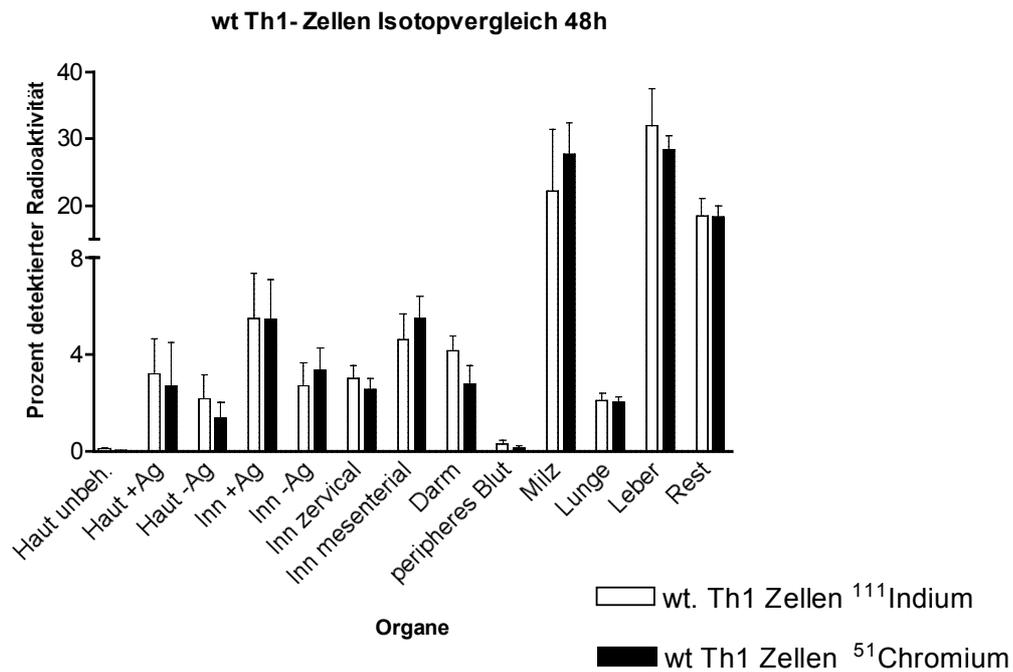


B

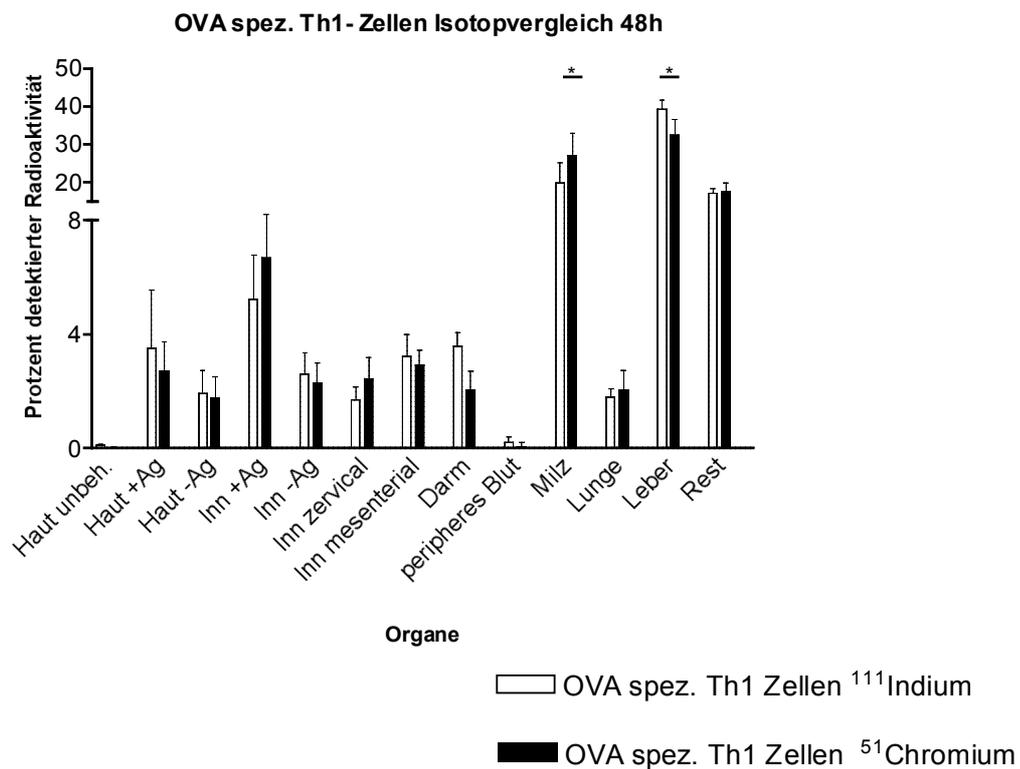
OVA spez. Th1- Zellen Isotopvergleich 24h



C



D

**Abbildung 7:**

Einfluss der unterschiedlichen Radioaktivmarkierung auf die Messung des Migrationsverhaltens adoptiv transferierter T-Effektorzellen. Wt- und OVA-spezifische Th1-Zellen wurden mit ¹¹¹In oder ⁵¹Chrom markiert und gemeinsam in Tiere mit akuter Inflamationsreaktion transferiert. Untergruppen wurden in „Markertausch“-Kombinationen markiert, die entsprechenden Organe isoliert und die spezifische Aktivität gemessen. Dargestellt ist der Vergleich der Markierung mit unterschiedlichen Radioisotopen von wt- oder OVA-spezifischen Th1-Zellen zu unterschied-

lichen Zeitpunkten. Gezeigt wird die Markierung in der Frühphase nach 24 h mit $^{51}\text{Chrom}$ oder ^{111}In der wt- (Abbildung 7a) und OVA-spezifischen (Abbildung 7b) Zellen und nach 48 h (Abbildung 7c und 7d) ($n = 6$, Mann Whitney U Test, $* = p < 0,05$).

4.5 Die Modulation des Inflammationsherdes durch lokale Aktivierung Ag-spezifischer T-Effektorzellen führt zu verstärkter Th1-Zellrekrutierung

Die Akkumulation von T-Effektorzellen innerhalb der Antigen enthaltenden Entzündungsreaktion war in der Frühphase nach obigem Modell erhöht. In dem verwendeten Modell (3.3.1 Abbildung 2) waren jedoch die Induktion der Inflammationsreaktion und die Messung der Effektorphase simultan angelegt. Um die Induktions- und Effektorphase separat zu untersuchen, wurde das Modell wie folgt modifiziert: Initial erfolgte der Transfer von unmarkierten Ag-spezifischen (OVA TCR^{tg}) T-Effektorzellen in wt (Balb/c)-Rezipienten, die sich unter nicht-inflammatorischen Bedingungen systemisch verteilen. 24 h später erfolgte die Ag-Applikation (OVA Peptid in IFA) in die Fußsohle, wodurch eine lokale Peptid-DTH ausgelöst wurde. Dies war vermittelt durch die bereits transferierten Ag-spezifischen T-Effektorzellen. Durch Verwendung von OVA-Peptid gegenüber Protein wurde die lokale Ag-Präsentation erhöht. Charakteristisch war eine Fußschwellung 24 h nach Ag-„Challenge“ (Abbildung 3a und b).

Um die Akkumulation von Ag-spezifischen versus Ag-unspezifischen Zellen in der Effektorphase zu untersuchen, wurden nun unterschiedlich markierte Indikatorzellen (OVA-TCR^{tg}- und wt-CD4⁺-T-Effektorzellen) 24 h nach Auslösen der DTH simultan in die bestehende Inflammation transferiert. Mit diesem Ansatz zeigte sich eine unspezifische Akkumulation von T-Effektorzellen innerhalb der Antigen enthaltenden Inflammation mit geringer Dominanz der wt-Zellen nach 24 h und 48 h (Abbildung 8). Eine isolierte Ansammlung von Ag-spezifischen T-Effektorzellen zeigte sich in diesem alternativen Modell nicht und die Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der simultanen Induktions- und Effektorphase (4.3.1 Abbildung 6).

Im modifizierten Modell zeigte sich jedoch durch den stärkeren Ag-Reiz bei Verwendung von Peptid und nicht Gesamtprotein eine stärkere Inflammationsreaktion. Es zeigte sich auch – wie im vorigen Inflammationsmodell (Abbildung 5) – die verstärkte Ansammlung von unspezifischen T-Effektorzellen in Ag-drainierenden Lymphknoten nach 24 h, die nach 48 h nicht mehr nachweisbar war.

Kotransfer von Th1- Zellen in eine T-Zell vermittelte DTH

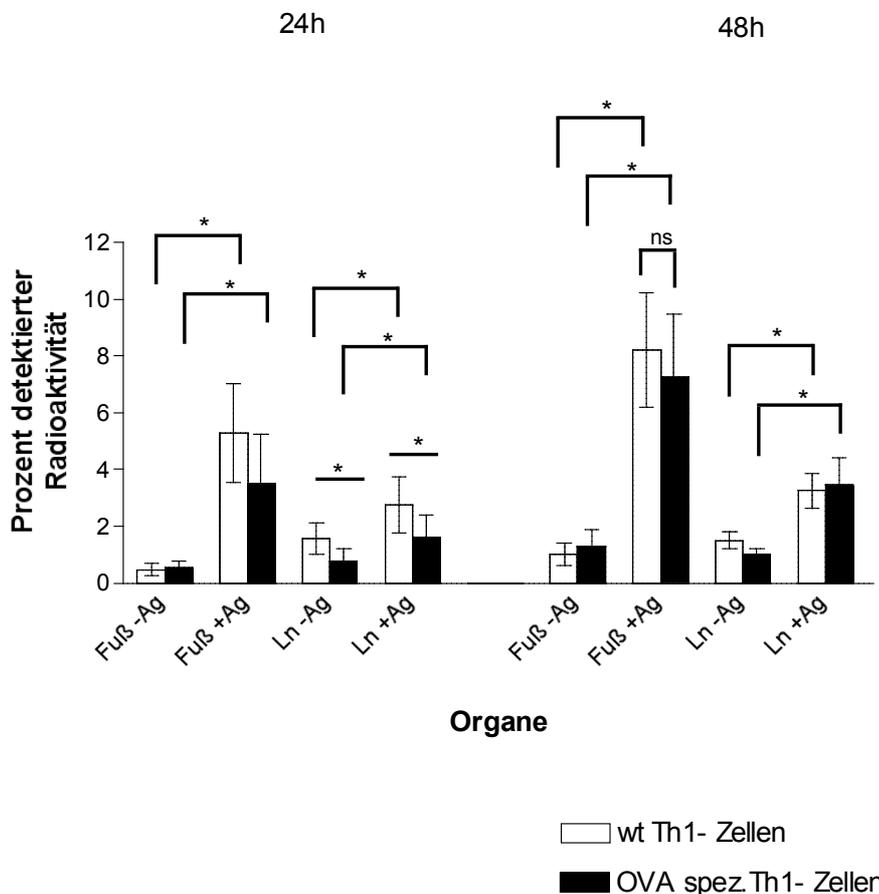


Abbildung 8:

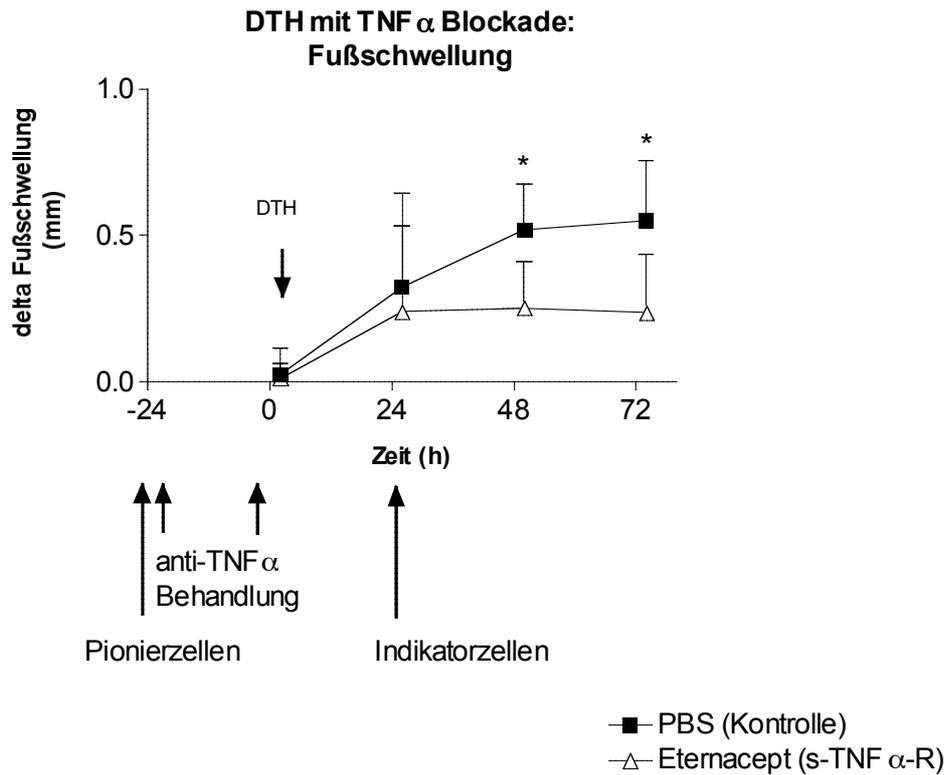
Untersuchung der Migration Ag-spezifischer T-Effektorzellen gegenüber wt-T-Effektorzellen in der Ag-vermittelten DTH (3.3.2 Abbildung 3) durch radioaktiv markierte T-Effektorzellen im zeitlichen Verlauf. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der gemessenen Radioaktivität in Abbildung 8 nach 24 h und 48 h nach Auslösen einer Ag-induzierten Inflammation am Inflammationsort und den drainierenden Lymphknoten (n = 8, Test für Vergleich gleicher Zellart an verschiedenen Lokalisationen: Wilcoxon für gepaarte Stichproben, Vergleich unterschiedlicher Zellarten an derselben Lokalisation Mann Whitney U, * = p < 0,05, ** = p < 0,001).

4.6 Mechanismen der Konditionierung: Einfluss von $TNF\alpha$ auf die Konditionierung des Gewebes

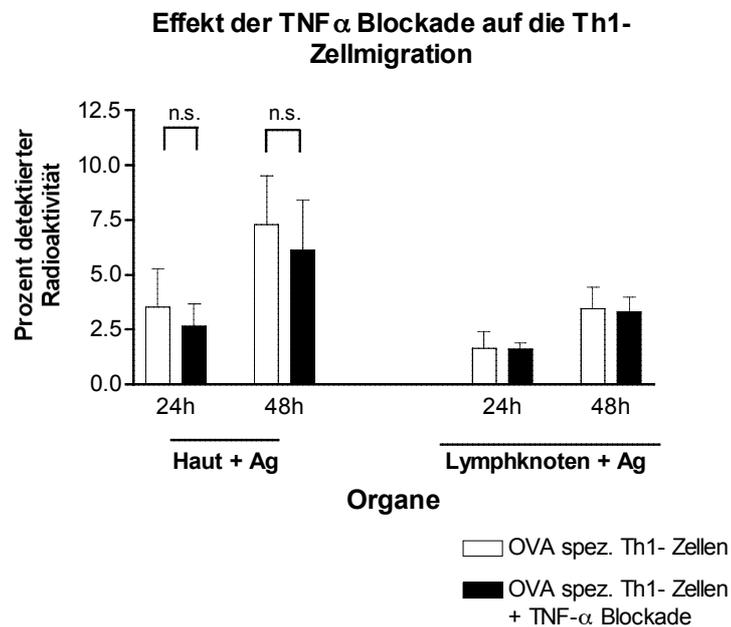
Die vorliegenden Daten zeigten den konditionierenden Einfluss von Ag-spezifischen T-Effektorzellen auf die lokale Entzündungsreaktion mit einer unspezifischen Rekrutierung von T-Effektorzellen an dem Inflammationsort. Es war anzunehmen, dass die lokale Ag-abhängige Aktivierung der T-Zellen zur Freisetzung von Mediatoren führt, die das Endothel entzündlich verändern (d. h. zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen führen), oder dass indirekt über

die Aktivierung von anderen gewebsständigen Zellen eine sekundäre Modulation des Gewebes vermittelt wird. Effektormoleküle von T-Effektorzellen, die diese Funktionen vermitteln können, sind $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$. $TNF\alpha$ ist von großer Bedeutung für das Auslösen der DTH durch Förderung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die DTH-Reaktion. Eine erfolgreiche immunsuppressive Therapiestrategie mit der Blockade von $TNF\alpha$ hat sich in den letzten Jahren bei Autoimmunerkrankungen, wie dem Morbus Crohn oder der rheumatoiden Arthritis entwickelt[135]. Um die Rolle von $TNF\alpha$ in der Effektorzell-Migration zu untersuchen, wurde $TNF\alpha$ vor Auslösen der Ag-spezifischen Reaktion geblockt und die Migration von radioaktiv markierten T-Effektorzellen in akute Inflamationsreaktionen untersucht. Die Behandlung mit Etanercept[115], einem Konstrukt aus 2 p75 Untereinheiten des $TNF\alpha$ -Rezeptors verbunden mit dem Fc-Fragment aus humanen IgG1, führte zu einer signifikanten Reduktion der Fußschwellung 48 bis 72 h nach Auslösen der Inflammation (Abbildung 9a) mit Erreichen einer maximalen Schwellung nach 24 h. Die Immigration von T-Effektorzellen in die Haut wurde durch die $TNF\alpha$ -Blockade irrespektive der Ag-Spezifität leichtgradig reduziert, während die Akkumulation innerhalb des Lymphknotens nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 9b). Die Etanercept-Behandlung inhibierte eine Zunahme der Schwellung der Fußsohle nach 24 h und im Verlauf zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Migration der Ag-spezifischen T-Effektorzellen gegenüber den Kontrollen. Dies legte eine vorrangige Bedeutung von $TNF\alpha$ für die Inflamationsstärke, jedoch nicht für die T-Zell-Migration nahe.

A



B

**Abbildung 9:**

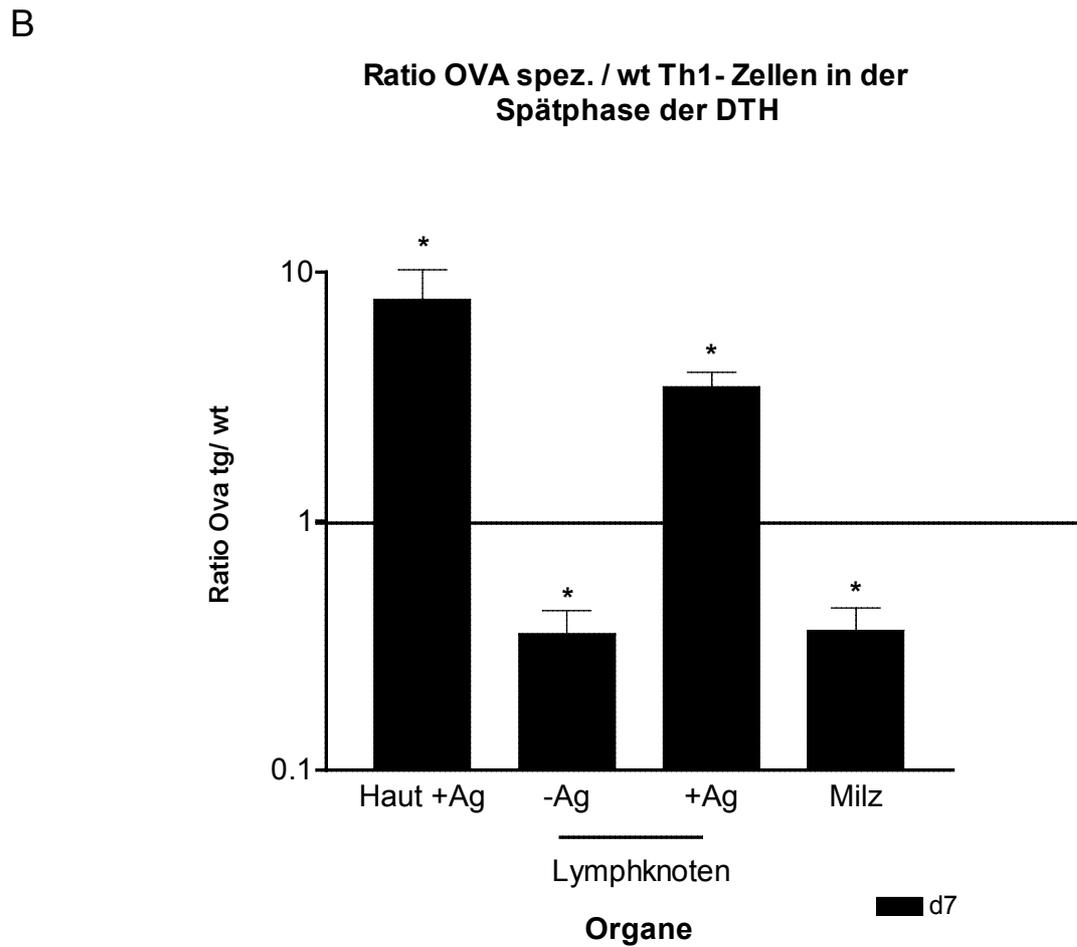
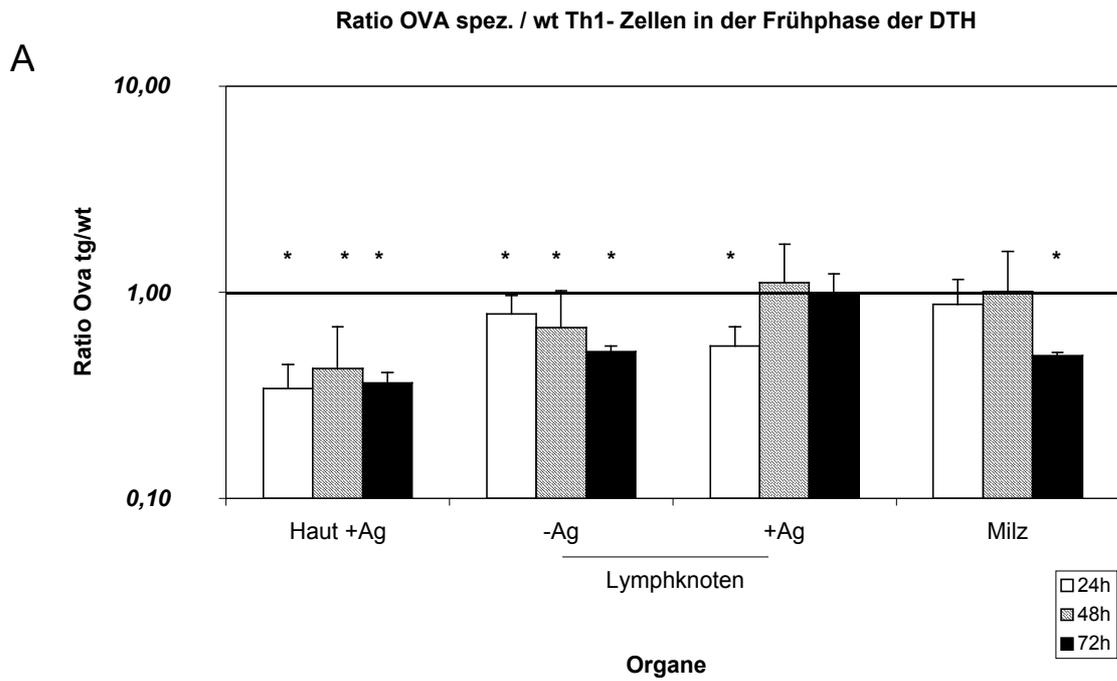
Effekt der TNF α -Blockade auf die Ag-spezifische Rekrutierung von T-Effektorzellen im Verlauf der Ag-spezifisch ausgelösten Inflamationsreaktion. Eine DTH wurde wie in Abbildung 3 ausgelöst. 24 h und 2 h vor Transfer der radioaktiv markierten OVA-spezifischen Th1-Zellen wurde eine Behandlung mit Etanercept (TNF α p75 Rezeptor-Konstrukt) durchgeführt. Abbildung 9a zeigt den Verlauf der Fußschwellung der Ag-ausgelösten Inflamationsreaktion in Differenz zur Kontrollinflammation. Abbildung 9b zeigt die Akkumulation der radioaktiv markierten OVA-spezifischen Th1-Zellen in der Inflamationsreaktion und den drainierenden Lymphknoten nach 24 h und 48 h (0-50 h: n = 15, 72 h: n = 8, * = p < 0,05, Mann-Whitney-U-Test).

4.7 Die Spätphase der Inflammationsphase ist dominiert von einem Ag-spezifischen T-Effektorzellinfiltrat

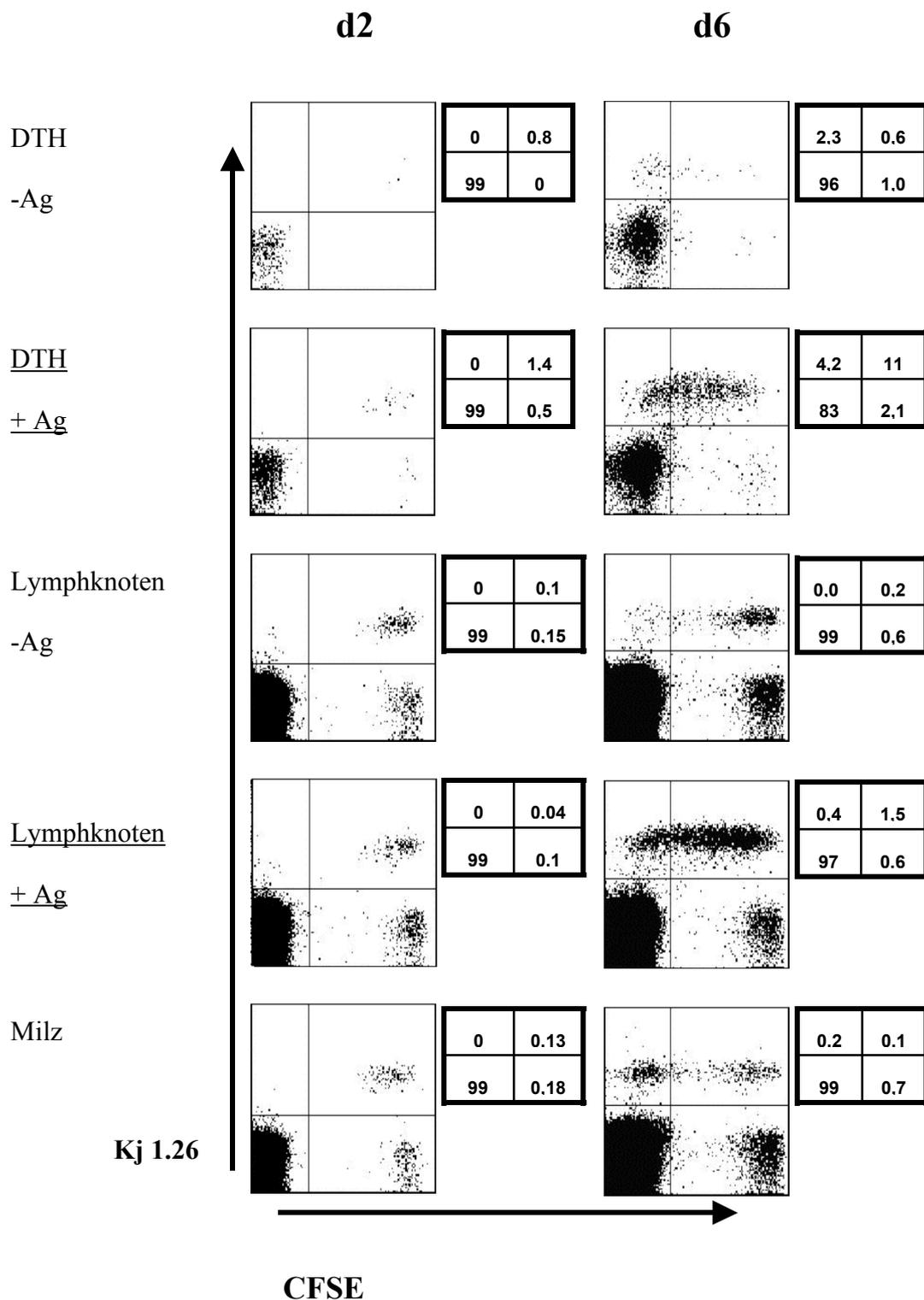
Im Zeitraum bis zu 2 Tagen nach Transfer der T-Effektorzellen zeigte sich eine unspezifische Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen am Ort der Inflammation. Dies stand im Gegensatz zu der bisher postulierten Ag-spezifischen Migration, die insbesondere durch die Untersuchungen zu späten Zeitpunkten von Reinhardt et al. unterstützt wurde[88]. Um die Verteilung/Akkumulation der Ag-spezifischen gegenüber den polyklonalen T-Effektorzellen in der späten Inflammationsphase zu untersuchen, wurde die Akkumulation von OVA-TCR^{tg}- und wt-T-Effektorzellen in der Hautreaktion 7 Tage nach Kotransfer untersucht. OVA-spezifische und wt-T-Effektorzellen wurden dazu 24 h nach Auslösen einer DTH mit Ag-spezifischen Pionierzellen und OVA-Peptid in die Rezipienten transferiert. Eine Untersuchung mit radioaktiv markierten T-Zellen ist aufgrund methodischer Limitationen hier nicht mehr möglich. Die Zellen wurden daher in diesem experimentellen Ansatz vor dem Transfer mit dem Fluoreszenzfarbstoff (CFSE) intrazellulär markiert, das zu untersuchende Gewebe zu den angegebenen Zeitpunkten verdaut, die infiltrierenden Zellen isoliert und nach Oberflächenfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern im Durchflusszytometer analysiert. OVA-spezifische T-Effektorzellen konnten durch einen klonotypischen Antikörper (KJ1.26.1) gegen den transgenen T-Zell-Rezeptor von den wt-Zellen unterschieden werden. Nach 24 h, 48 h, 72 h und nach 7 Tagen wurde die Ratio zwischen KJ1.26.1-positiven und KJ1.26.1-negativen Zellen innerhalb der CFSE-positiven Population in der Antigen enthaltenden Fußsohle, der Kontrollfußsohle, der drainierenden Lymphknoten beider Inflammationsreaktion und der Milz untersucht (Abbildung 10a-c).

Es kamen zwei Modelle zum Einsatz: Die Experimente zu frühen Zeitpunkten wurden analog zu den Radioaktivexperimenten (Homing-Experimenten) mit unmarkierten Pionier-Induktorzellen durchgeführt, um die Migration in ein bestehendes aktives inflammatorisches Milieu zu untersuchen. Die Experimente zu späten Zeitpunkten wurden ohne Pionierzellen durchgeführt, da diese unmarkierten Ag-spezifischen T-Effektorzellen zu späten Zeitpunkten von proliferierten Indikatorzellen mittels CFSE-Markierung nicht mehr differenziert werden können. Die Kinetik der Fußschwellung war in beiden Inflammationsmodellen gleich. In der Frühphase – bis zu 3 Tagen nach Auslösen der Inflammation – zeigte sich ein geringer Unterschied zwischen polyklonalen und Ag-spezifischen T-Effektorzellen mit geringgradig verstärkter Ansammlung von polyklonalen wt-T-Zellen am Inflammationsort. Abbildung 10a zeigt die Ratio der Ag-spezifischen zu wt-T-Effektorzellen. Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen mit radioaktiv markierten Indikatorzellen (Abbildung 6 und 8).

Nach 7 Tagen zeigte sich jedoch eine sehr starke Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen in den Ag-exponierten Organen Haut und Lymphknoten. Beobachtet wurde eine bis zu 10fach erhöhte Ratio der Ag-spezifischen T-Effektorzellen gegenüber den wt-T-Effektorzellen in der Antigen enthaltenden Haut und den Lymphknoten (Abbildung 10b und c) und es zeigte sich eine Abreicherung der Ag-spezifischen T-Effektorzellen gegenüber wt-Zellen im Kontrolllymphknoten und der Milz. Die Ag-spezifischen T-Effektorzellen nahmen in der Antigen enthaltenden Hautreaktion sogar einen signifikanten Teil der gesamten CD4⁺-Population, inklusive der endogenen T-Zellen der Maus, ein. Anhand des CFSE-Verlusts zeigte sich eine deutliche Proliferation der Ag-spezifischen gegenüber den Ag-unspezifischen T-Effektorzellen (Abbildung 10c: d6 DTH + Ag).



C

**Abbildung 10:**

Die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Ag- und der polyspezifischen CD4⁺-Effektorzellen nach synchronem Transfer in eine akute DTH. Abbildung 10a zeigt die Ratio der detektierten OVA-spezifischen zu wt-Th1-Zellen im Zeitraum von 1-3 Tagen. Die Ratio der OVA-spezifischen und wt-Th1-Zellen nach 7d ist in Abbildung 10b dargestellt. Untersucht wurden die Inflammationsreaktionen der Haut, die Ag- und Kontrollpeptid drainierenden Lymphknoten und die Milz. Aus der Hautreaktion mit Kontrollpeptid ließ sich erwartungsgemäß nur eine sehr geringe Zellzahl isolieren, die eine verlässliche Messung nicht zuließ. Exemplarisch ist eine FACS-Analyse zur Charakterisierung des zellulären Infiltrats in Abbildung 10c dargestellt (n = 3, Student T Test, * = p < 0,05).

5 Diskussion

Die Regulation von Inflammationsreaktionen ist u.a. abhängig von der ortsspezifischen Funktion Ag-spezifischer T-Helferzellen. Th1-Effektorzellen haben eine zentrale Funktion in der Auslösung der akuten Inflammationsreaktion, welche durch eine Ag-spezifische Aktivierung durch TCR-Aktivierung erfolgen kann. Bisherige Vorstellungen über die Migration dieser wichtigen proinflammatorischen T-Zellpopulation deuteten auf mehrere Konsequenzen von Ag am Inflammationsort für die Inflammationsantwort. Neben der Reaktivierung am Ort der Inflammation sollte Ag auch eine Rolle für die Ag-spezifische Lokalisation von T-Effektorzellen haben. Die Retention Ag-spezifischer T-Effektorzellen in nicht-lymphatischen Organen wurde durch einen Mechanismus erklärt, in dem Ag-spezifische T-Effektorzellen nach Ag-spezifischer Aktivierung und Proliferation im Lymphknoten und Ag-unspezifischer Migration durch das aktivierte Endothel präzise am Ort der Ag-Präsentation in peripheren Inflammationsreaktionen akkumulieren.

Untersuchungen zu Ag-spezifischen Interaktionen zwischen T-Effektorzellen und Ag-beladenen APCs konnten In-vitro in Kollagenmatrixmodellen[136, 137], In-vivo in Lymphknoten[138] und in verschiedenen T-Zell-abhängigen Inflammationsmodellen in nicht-lymphoiden Organen, wie der Haut (DTH)[88], dem Pankreas (Pankreatitis)[139] und dem zentralen Nervensystem (EAE)[106], eine verlangsamte Migrationsgeschwindigkeit der Ag-spezifischen T-Effektorzellen nachweisen. Dieser Nachweis der Migrationsverlangsamung legte auf molekularer Ebene ein Ag-spezifisches „Trapping“ von Ag-spezifischen T-Effektorzellen in der peripheren Entzündungsläsion nahe. Insbesondere die direkte Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit Ag-beladenen MHC-II-Molekülen schien von Bedeutung für die Migration durch das Gewebe und somit die T-Effektorzell-Akkumulation zu sein. Jedoch existieren widersprüchliche Ergebnisse aus anderen Arbeiten, die eine Ag-spezifische Lokalisation von T-Effektorzellen durch Ag-Präsentation auf MHC-II-Komplexen verneinen[39, 52, 108-111].

Die hier vorgestellten Experimente zeigen vier wesentliche Ergebnisse zu den kontroversen Vorstellungen der Effekte von Antigenen auf die Lokalisation von T-Effektorzellen.

1. Die Präsenz von spezifischem Antigen führt zur Aktivierung weniger ortsständiger Ag-spezifischer T-Effektorzellen. Diese Aktivierung bewirkt eine Konditionierung der lokalen Entzündungsregion und führt zu einer deutlich erhöhten Immigration von T-Effektorzellen und anderen Leukozyten.

2. Die folgende deutlich verstärkte Akkumulation von T-Effektorzellen erfolgt unabhängig von deren Spezifität.
3. Über einen Zeitverlauf von mehreren Tagen kommt es zu einer deutlichen Dominanz Ag-spezifischer T-Effektorzellen im Ag-beladenen Entzündungsgebiet.
4. Die Blockade des Th1-Effektorzytokins TNF α hat eine geringe Auswirkung auf die Migration von T-Effektorzellen.

5.1 Die Präsenz von spezifischem Antigen führt zur Aktivierung weniger ortsständiger Ag-spezifischer T-Effektorzellen mit Konditionierung der lokalen Entzündungsregion

T-Effektorzellen, die Ag-spezifisch aktiviert werden, schütten im Rahmen der Aktivierung in nicht-lymphoiden Organen Effektorzytokine aus. Diese inflammatorische Konditionierung durch eine sehr kleine Anzahl von Ag-spezifischen Zellen führt zur Rekrutierung weiterer Effektorzellen und zur Entwicklung der akuten Inflammationsreaktion. Wie die Abbildungen 3, 5, 6 und 8 zeigen, wird eine spezifische Entzündungsreaktion nach Ag-Applikation nur in Anwesenheit von Ag-spezifischen T-Effektorzellen ausgelöst. T-Zell-abhängige Zytokine, die diese Reaktion steuern, sind vornehmlich TNF α und IFN γ [140]. Insbesondere IFN γ , das aus aktivierten Th1-Effektorzellen sezerniert wird, hat einen direkten Einfluss auf Endothelzellen. Durch Aktivierung von Oberflächenrezeptoren auf Endothelzellen wird eine Induktion von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1[141] und ICAM-1, E- und P-Selektinen[142] sowie MHC-II-Molekülen[93, 94] vermittelt. TNF α vermittelt ebenfalls eine Induktion von E- und P-Selektinen[143] sowie von VCAM-1 und ICAM-1[144]. Eine weitere Verstärkung der DTH-Reaktion kann durch sekundäre Effekte erfolgen, wie z. B. der Aktivierung von Mastzellen[145-147], die Serotonin[148, 149] und TNF α sezernieren[150, 151]. Dies trägt zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität und der vermehrten Ödementstehung bei. Modelle der DTH-Reaktion mit polyklonalen Zellpopulationen konnten die T-Zell-Abhängigkeit dieser Reaktion bereits in den 80er-Jahren zeigen[152]. Die Bedeutung von Ag-spezifischen Zellen für die Entwicklung einer akuten Inflammationsantwort konnte dann auch, in anderen T-Zell-abhängigen Inflammationsmodellen, wie der EAE, gezeigt werden[106]. Die wichtige Bedeutung der Th1-vermittelten Konditionierung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Th1-Zytokine IFN γ und TNF α in der Frühphase der Inflammation eine zentrale Rolle spielen[153].

Die Bedeutung monoklonaler Ag-spezifischer Pionierzellen für die Auslösung einer akuten Inflammationsreaktion und die Rekrutierung weiterer T-Effektorzellen bestätigt sich in den hier

vorgestellten Experimenten. Im Inflammationsmodell mit simultaner Auslöse- und Effektorphase (3.3.1, Abbildung 2) und dem Modell mit getrennter Auslöse- und Effektorphase (3.3.2, Abbildung 3) sind wenige Ag-spezifische T-Effektorzellen in der Lage, nach lokalem Kontakt mit dem spezifischen Antigen eine akute Inflammationsreaktion auszulösen (Abbildung 5, 6 und 8). Lokales Antigen kann somit zur lokalen Reaktivierung von T-Effektorzellen führen und eine akute Inflammationsreaktion auslösen. Die Spezifität der Inflammationsreaktion ist insbesondere zur Beantwortung der Frage nach einem Ag-spezifischen Trapping von T-Effektorzellen wichtig, denn durch die Ag-spezifische Auslösung der Inflammationsreaktion ist eine lokale Funktion des Antigens bewiesen. Der Frage nach weiteren Funktionen von Antigen in peripheren Inflammationsreaktionen, insbesondere dem Ag-spezifischen Trapping wird im Folgenden nachgegangen.

5.2 Die sekundäre Akkumulation von T-Effektorzellen erfolgt unabhängig von deren Ag-Spezifität

Nach der Ag-abhängigen Konditionierung des Gewebes mit Induktion der Inflammation erfolgt eine weitere Akkumulation von Th1-Effektorzellen. Vermutet wurde bisher eine Ag-spezifische Retention von T-Effektorzellen, etwa durch direkte Interaktion zwischen DC und T-Zellen oder durch sekundäre Effekte der Ag-spezifischen T-Zellaktivierung, die zur Ag-spezifischen Lokalisation beitragen. Die Frühphase der Inflammationsreaktion wurde jedoch bisher in Bezug auf Ag-abhängige Prozesse ungenügend untersucht; insbesondere wurden alle vorliegenden Studien zur Migration in entzündetes peripheres Gewebe nur mit Ag-spezifischen T-Effektorzellen (entweder Immunisierung oder adoptiver Transfer) untersucht. Eine Kontrolle mit simultanem Transfer von nicht Ag-spezifischen Zellen wurde jedoch nicht durchgeführt. Die hier vorgestellten Ergebnisse (Abbildung 5, 6, 8) der Migrationsuntersuchungen in zwei unterschiedlichen T-Zell-abhängigen Inflammationsmodellen zeigen eine Ag-unabhängige Anreicherung von T-Effektorzellen unterschiedlicher Ag-Spezifitäten zu frühen Zeitpunkten der Inflammationsreaktion. Dies widerlegt die bisher gemachten Schlussfolgerungen der Beobachtung eines Ag-spezifischen Infiltrats in verschiedenen Inflammationsmodellen mit definiertem Antigen zu späten Zeitpunkten[88]. Für die Frühphase scheinen daher Ag-unspezifische Mechanismen eine wichtigere Rolle zu haben. Hier vermitteln insbesondere Selektine die T-Effektorzellmigration in periphere Gewebe. Durch Migration und lokaler Reaktivierung von Ag-spezifischen T-Effektorzellen kommt es zur Verstärkung der Inflammation[88, 142, 154], welche durch die Blockade von E- und P- Selektinen inhibiert werden kann[58]. Weiterhin konnten Hwang et al. in einem Kontakthyper sensitivitätsmodell (Contact sensitivity) eine Subgruppe von

E- und P-Selektin-positiven, Ag-spezifischen T-Effektorzellen nachweisen, die durch IFN γ -Produktion ein T-Zell-Immigration förderndes Milieu schaffen. Diese wurden als „Pionier“-Zellen charakterisiert[142]. Eine besondere Rolle spielt hierbei die E- und P-Selektin-vermittelte Rekrutierung dieser „Pionier“-T-Effektorzellen innerhalb der ersten 2 Stunden nach Auslösen der Inflammation. Die Blockade der T-Effektorzell-Migration in diesem Zeitraum führte zu einer Blockade der weiteren Inflammationsreaktion[142] und unterstreicht die Bedeutung Ag-unabhängiger Adhäsionsprozesse zur Rekrutierung von T-Effektorzellen für das Auslösen der Inflammationsreaktion.

Nach der initialen Ag-spezifischen Auslösung der Inflammationsreaktion haben somit alle T-Effektorzellen Zugang zum entzündeten Gewebe und eine Ag-spezifische Rekrutierung findet in der Frühphase nicht statt.

5.3 Die Dominanz Ag-spezifischer T-Effektorzellen im Ag-exponierten Inflammationsgebiet entwickelt sich im Verlauf über Tage

Die Diskrepanz der hier gemachten Beobachtungen zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zur T-Effektorzell-Migration legte die Frage nach der Vergleichbarkeit der gewählten Modelle mit den bisher gemachten Beobachtungen nahe.

Insbesondere die Ergebnisse der Migrationsassays der frühen Zeitpunkte scheinen im Gegensatz zu Folgerungen von Reinhardt et al.[88] zu stehen, die ein Ag-spezifisches Infiltrat von T-Effektorzellen am Ort der Ag-Deposition zu späten Zeitpunkten (7 Tage) nachweisen konnten und auf ein Ag-spezifisches „Trapping“ zu frühen Zeitpunkten schlossen. Die hier vorgestellten Untersuchungen der späten Phase der Inflammation (6-7 Tage) zeigen jedoch – vereinbar mit den veröffentlichten Beobachtungen – eine Akkumulation Ag-spezifischer T-Effektorzellen (Abbildung 10) am Ort der Antigen enthaltenden Inflammation. Erklärt werden kann diese Beobachtung durch mehrere Mechanismen: zum einen durch lokale Proliferation und zum anderen durch ein Ag-spezifisches Trapping in der Spätphase. Das späte T-Effektorzellinfiltrat umfasst mehrere Generationen proliferierter Ag-spezifischer T-Effektorzellen (Abbildung 10c) und kann somit Resultat einer Proliferation lokal restimulierter Ag-spezifischer T-Effektorzellen sein. Diese sind prolongiert lokalen Aktivierungssignalen ausgesetzt und haben somit einen Proliferationsvorteil gegenüber den polyklonalen T-Effektorzellen, die ohne Restimulation einen ruhenden T-Zell-Phänotyp annehmen und aus dem Gewebe auswandern. Diese Folgerung wird durch die Arbeiten von Obst et al. gestützt, die für CD4⁺-T-Effektorzellen die Notwendigkeit einer prolongierten Ag-Präsentation für eine anhaltende Proliferation nachweisen konnten[155]. Durch

konditionierte Expression von Antigenen durch APCs ließ sich eine direkte Abhängigkeit der Proliferation von CD4⁺-Zellen von APCs nachweisen. Im Gegensatz hierzu steht das Verhalten von CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen, die nach Ag-Exposition eine „autopilot“-Expansion durchführen[156-158]. Alternativ kann ein Ag-spezifisches Trapping zu späten Zeitpunkten die Dominanz von Ag-spezifischen T-Effektorzellen erklären. Neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe Hamann (Doebis et al.) zeigen eine geringe Einwanderung von T-Effektorzellen in eine Inflamationsreaktion zu späten Zeitpunkten, so dass durch eine beständige geringgradige Migration eine selektive Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen erklärt werden könnte. Bei Blockade dieser Migration zeigt sich jedoch eine weitere Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen durch lokale Proliferation. Die unspezifische Migration von T-Effektorzellen zu frühen Zeitpunkten schließt somit nicht die Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen zu späten Zeitpunkten aus. Möglicherweise spielen lokale Proliferation und anhaltende Migration von Ag-spezifischen T-Effektorzellen eine wichtige Rolle.

5.4 Die Bedeutung von TNF α

In der Induktionsphase der DTH haben die Zytokine IFN γ und TNF α eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Endothels und steuern die Intensität der Reaktion durch Makrophagenaktivierung[159], Regulation lokaler IL12-Expression[160], Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Mastzellaktivierung[146, 147, 161].

Um die Bedeutung von TNF α während der Gewebskonditionierung für die nachfolgende T-Effektorzell-Rekrutierung zu untersuchen, wurde TNF α vor Auslösen der Inflammation mittels Etanercept blockiert. Dies führte zu einer Reduktion der lokalen Inflammation mit verminderter Fußschwellung, jedoch kam es lediglich zu einer geringen Reduktion der T-Effektorzell-Rekrutierung (Abbildung 9). Hieraus folgt, dass die Blockade von TNF α in der DTH vor allem die T-Effektorzell-Funktion und weniger deren Lokalisation in der Frühphase der Inflammation reguliert. Ein wichtiger Folgeeffekt der T-Zell-Aktivierung ist die TNF α -abhängige Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten[159]. Die Beobachtung der Reduktion der Schwellung nach TNF α -Blockade – bei geringgradig reduzierter T-Zell-Migration – deutet auf die hauptsächliche Bedeutung der neutrophilen Granulozyten für die Entstehung des Ödems in der frühen Inflamationsantwort hin. Das wichtige proinflammatorische Zytokin TNF α trägt somit zur Modulation der Inflamationsantwort in der Frühphase bei, hat jedoch eine geringe Auswirkung auf die Effektorzell-Migration.

5.5 Die Rolle des Endothels in der Ag-spezifischen Effektorzell-Migration

Die Rolle des Endothels für die Ag-spezifische Migration von T-Effektorzellen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es existieren Hinweise aus In-vitro-Untersuchungen, dass dieser Mechanismus auf humanem Endothel existiert; welche genaue Rolle er zur Rekrutierung von T-Effektorzellen hat, ist jedoch unklar[162]. Die Rolle des Endothels wurde in den hier gemachten Untersuchungen nicht direkt adressiert. Der Nachweis einer gleichen Akkumulationsrate von Ag-spezifischen wie unspezifischen T-Effektorzellen in der frühen Ag-spezifisch ausgelösten Inflamationsreaktion zeigt jedoch, dass eine endotheliale Ag-Präsentation, die experimentell nachgewiesen wurde[93, 94], In-vivo in der akuten Inflamationsreaktion eine untergeordnete Bedeutung für die T-Effektorlokalisation zu frühen Zeitpunkten hat. Die In-vitro-Differenzierung der T-Effektorzellen hat einen großen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit. Ein systematischer Fehler ließ sich durch die vergleichbare Expression der für die kutane Migration essentiellen P-Selektin-Liganden (Abbildung 4a) der Ag-spezifischen und der Kontrollzellen ausschließen. Somit hat die endotheliale Ag-Präsentation eine geringe Bedeutung für die Ag-spezifische Migration von T-Effektorzellen in einen akuten Inflamationsherd. Eine selektive Aktivierung eines solchen Mechanismus zu späten Zeitpunkten scheint wenig wahrscheinlich, insbesondere, da zu späten Zeitpunkten E- und P-Selektine eine wichtige Rolle spielen und die Blockade dieser eine Migration von T-Effektorzellen inhibierte, d. h. nicht durch andere Adhäsionsvorgänge überwunden wurde (siehe 5.3, unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) [142, 163].

5.6 Die T-Effektorzell-Migration in nicht inflammatorische Organe

Die In-vivo-Verteilung der transferierten Zellen in Organe, die nicht mit Antigen behandelt wurden, sollte zufällig, d. h. unabhängig von der Ag-Spezifität erfolgen. Beobachtet wurde jedoch eine geringgradig verstärkte Anreicherung von Ag-spezifischen T-Effektorzellen in der Leber in der Frühphase.

Biologische Mechanismen zur Erklärung einer verstärkten Anreicherung Ag-spezifischer T-Effektorzellen in der Leber

In beiden verwendeten Inflamationsmodellen (Protein- und Peptidimmunisierung) wurde zu frühen Zeitpunkten eine höhere Frequenz von Ag-spezifischen im Vergleich zu polyklonalen T-Effektorzellen in der Leber beobachtet (Abbildung 5, 6 und 8). Dieser Effekt war sehr gering, doch nach 48 h signifikant. Ein Einfluss der In-vitro-Differenzierung der T-Effektorzellen erscheint unwahrscheinlich, da vergleichbare Zellpopulationen generiert wurden, die sich in

Differenzierung, Substrateinheit oder Aktivierungsgrad nicht unterschieden (Abbildung 4). Die beobachtete Mehranreicherung der Ag-spezifischen T-Effektorzellen in der Leber erklärt sich hingegen möglicherweise durch die Konsequenzen einer Restimulation Ag-spezifischer Zellen In-vivo, wie dem Lymphknoten und der Milz. Ag-spezifische Zellen haben in beiden verwendeten Modellen In-vivo Kontakt zu dem spezifischen Antigen und erfahren eine Restimulation; hingegen sind die Kontrollzellen, In-vitro polyklonal stimuliert, In-vivo keinem zweiten Aktivierungssignal ausgesetzt. Die Reaktivierung differenzierter T-Effektorzellen kann neben der Reaktivierung und dem Auslösen der Effektorfunktion und Proliferation auch zur Apoptose führen[130, 134, 164]. Ein Trapping apoptotischer Zellen findet vorwiegend in der Leber statt[165, 166], so dass die beobachtete Akkumulation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen in der Leber auf eine Restimulation In-vivo zurückgeführt werden kann. Neben dem Effekt der selektiven Apoptoseinduktion der Ag-spezifischen Zellen kann auch ein selektives Trapping durch eine MHC-II-assoziierte Ag-Präsentation der Leberendothelien eine verstärkte Ansammlung der Ag-spezifischen T-Effektorzellen in der Leber erklären[167, 168]. Systemisch verteiltes Antigen könnte so in der Leber zu einer vermehrten Ag-Präsentation und Retention von Ag-spezifischen T-Effektorzellen führen. Die gemessenen Unterschiede waren statistisch signifikant, jedoch nicht sehr stark ausgeprägt, so dass ein sekundärer Einfluss auf die Verteilung der gesamten transferierten T-Zellpopulation unwahrscheinlich ist.

5.7 Methodische Limitationen der Untersuchung Ag-spezifischer T-Effektorzell-Migration

Radioaktive Markierung

Die Markierung der Lymphozyten für die Untersuchung der Migrationseigenschaften mit unterschiedlichen radioaktiven Isotopen kann durch unterschiedliche toxische Effekte der Radioisotope und das unterschiedliche Verhalten der Radioisotope in vivo zu einer ungenauen Messung führen. Der Ausschluss von systematischen Fehlern in den Organen Haut (Inflammation) und drainierenden Lymphknoten zeigt sich in Abbildung 7 (Abschnitt 4.4). Ag-spezifische und Kontroll-T-Effektorzellen wurden in unterschiedlichen Kombinationen mit den Radioisotopen Indium und Chrom markiert und im Migrationsassay untersucht. Die Verteilung der Kontroll-T-Effektorzellen war hier unabhängig von der Markierung mit den Radioisotopen Indium oder Chrom. Ag-spezifische T-Effektorzellen zeigten jedoch in Leber und Milz eine unterschiedliche Verteilung. Eine Verminderung des Indiumsignals in der Milz und Verstärkung in der Leber kann möglicherweise auf einen proapoptotischen Effekt des Antigens In-vivo auf Ag-spezifische

T-Effektorzellen zurückgeführt werden. Eine Ag-spezifische Reaktivierung in der Milz kann neben der Aktivierung auch einen apoptotischen Effekt auslösen, und apoptotische T-Effektorzellen akkumulieren danach präferentiell in der Leber[164, 165, 169-171]. Freies Indium verbleibt lokal in ortsständigen Makrophagen, während Chrom löslich über Plasma und schließlich renal eliminiert wird, so dass die Indiumanreicherung in der Leber durch einen apoptotischen Effekt erklärbar ist (siehe auch 3.4.1 und 4.4). Bei geringer Ausprägung dieses Effektes in Leber und Milz ist ein sekundärer Effekt auf die Verteilung in anderen Organen unwahrscheinlich, und die Untersuchungen der radioaktiv markierten Zellen lassen zu frühen Zeitpunkten eine genauere Messung der Verteilung zu.

Fluoreszenzmarkierung

Die Untersuchung der Migrationseigenschaften mit fluoreszenzmarkierten Lymphozyten wird eingeschränkt durch die harsche Isolationsprozedur mittels mechanischer Zerkleinerung und enzymatischen Verdau der Haut, welche nur den Nachweis lebender Zellen erlaubt und somit eine höhere Detektionsschwelle bedingt. In der Inflammationsreaktion der Haut mit Antigen und den drainierenden Lymphknoten ließen sich jedoch hinreichende Zellzahlen isolieren, die einen Vergleich der Migration von Ag-spezifischen und Kontroll-T-Effektorzellen erlauben.

Der Vergleich von Fluoreszenz- zu Radioaktivitätsmessung

In den Migrationsuntersuchungen zeigte sich mit Radioaktivitäts- und Fluoreszenzmarkierung in der Frühphase eine geringgradig vermehrte Ansammlung von Kontrollzellen in der Ag-exponierten Entzündungsreaktion. Im Fluoreszenzassay war dieser Effekt über 3 Tage nachweisbar (Abbildung 10a), hingegen mit der Radioaktivmarkierung nur für 24 Stunden (Abbildung 6 und 8 (24 h)). Dies kann möglicherweise auf eine höhere mechanische Empfindlichkeit der In-vivo restimulierten Ag-spezifischen T-Effektorzellen während der Isolationsprozedur zurückgeführt werden. Für die Untersuchungen der Frühphase sind daher die Ergebnisse der Radioaktivitätsmarkierungen ausschlaggebend; in der Spätphase des Fluoreszenzassays zeigte sich dieser Effekt nicht mehr und stellt bei der hohen isolierten Zellzahl keine wesentliche Einschränkung dar.

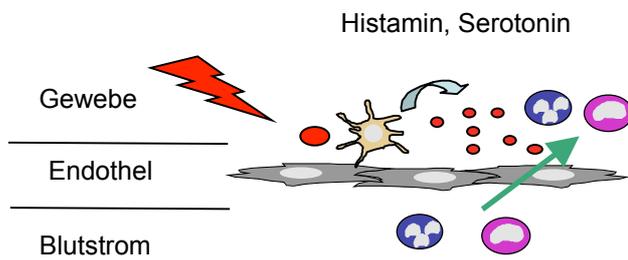
Diese Untersuchungen bestätigten somit die Validität des experimentellen Systems und damit der neuen Ergebnisse zur Migration von T-Effektorzellen zu frühen Zeitpunkten.

5.8 Modell der Migration Ag-spezifischer T-Effektorzellen

Basierend auf den vorgestellten Daten ergibt sich das folgende Modell (Abbildung 11):

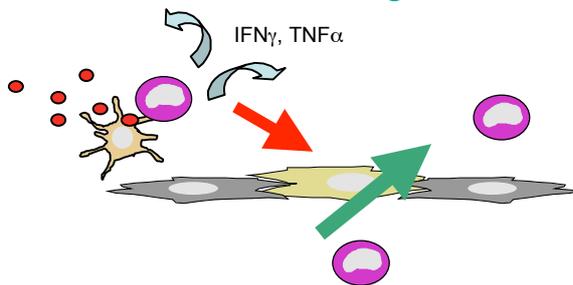
Im Rahmen der Primärantwort auf einen Antigenkontakt entstehen Th1-Effektorzellen, die sich unter homöostatischen Bedingungen in nicht-lymphatischen Organen im gesamten Körper verteilen. Nach Sekundärkontakt mit spezifischem Antigen kommt es zunächst zu einer lokalen unspezifischen Inflammationsreaktion, die durch eine Ag-spezifische Reaktivierung eingewanderter Ag-spezifischer T-Effektorzellen enorm verstärkt wird. Zentral hierfür ist die lokale Ausschüttung von Effektorzytokinen, insbesondere $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung des Endothels mit Expression von inflammationsassoziierten Homing-Molekülen (P-Selektin, E-Selektin, LFA-1, VCAM-1). Über diese wird eine weitere T-Effektorzell-Migration von aktivierten Lymphozyten vermittelt. Dieser Prozess ist nicht Ag-spezifisch, sondern differenzierungsspezifisch, d. h., alle T-Effektorzellen haben in der Frühphase Zugang zum Inflamationsgebiet. Durch die Endothelaktivierung wird gleichzeitig ein massiver Einstrom von Makrophagen und Granulozyten vermittelt, deren Effektorzytokine die Inflammation verstärken und den Zugang weiterer Effektorzellen zum affizierten Gewebe sicherstellen. In der Frühphase spielen Ag-spezifische Mechanismen, wie eine endotheliale Ag-Präsentation, Ag-spezifisches Trapping oder eine spezifische Regulation der Auswanderung aus dem Inflamationsgebiet, eine untergeordnete Rolle. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Dominanz Ag-spezifischer T-Effektorzellen aufgrund prolongierter Aktivierung, die zur lokalen Proliferation der Ag-spezifischen T-Effektorzellen in Lymphknoten und peripherem Gewebe führt. Somit entwickelt sich am Inflamationsort über den Zeitraum von Tagen ein Infiltrat aus Ag-spezifischen T-Effektorzellen, welches effektiv die Inflammationsreaktion unterstützt.

Unspezifische Auslösephase: 0-2 h



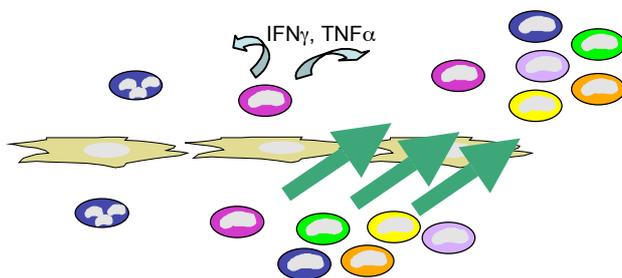
Der Gewebsschaden mit lokaler Ag-Deposition aktiviert lokale Abwehrzellen und Mastzellen. Eine gering-gradige unspezifische Rekrutierung von T-Effektorzellen folgt hierauf.

Lokale Reaktivierung: 2-24h



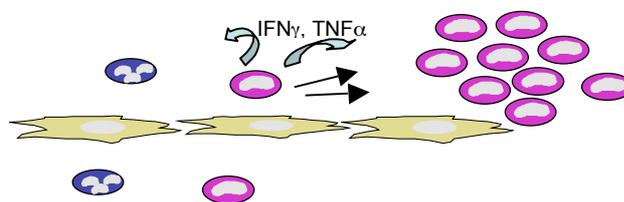
Ag-spezifische T-Effektorzellen („Pionierzellen“) werden lokal reaktiviert und lösen über eine Endothelaktivierung eine hochgradige T-Effektorzell-Migration aus, die nicht Ag-spezifisch ist.

Effektorphase der Immunpathologie: 24-48h



Die lokale Reaktivierung und Rekrutierung weiterer T-Effektorzellen und Leukozyten löst die Immunpathologie mit Schwellung und Gewebszerstörung aus.

Spätphase: 3-6d



Ag-spezifische T-Effektorzellen proliferieren lokal und dominieren die Inflamationsreaktion.

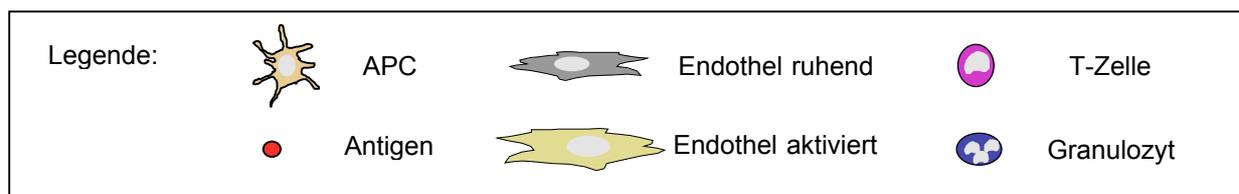


Abbildung 11: Modell einer T-Zell-abhängigen Effektorphase

6 Zusammenfassung

Lymphozyten dienen u.a. der Infektabwehr und erkennen Zielstrukturen(Antigen) über spezielle Oberflächenrezeptoren. T-Effektorlymphozyten zirkulieren durch nicht-lymphoide Gewebe und können bei Ag-spezifischer Aktivierung sehr potent eine akute Inflammationsreaktion vom verzögerten Typ am Ort der Antigenexposition auslösen. Die bisherigen Vorstellungen über die Effektor-T-Zell-Lokalisation gingen von einer Rolle des spezifischen Antigens als Stoppsignal für die Migration von T-Effektorzellen im inflammatorischen Kontext aus. Dies wurde in Analogie zu dem Verhalten von naiven T-Zellen geschlossen, die im Rahmen der Aktivierung bei Primärkontakt mit Antigen im Lymphknoten selektiv akkumulieren.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen durch den Vergleich der Lokalisation von Ag-spezifischen T-Effektorzellen In-vivo mit polyklonalen T-Effektorzellen mehrere Phasen der Migration. In der Frühphase der Inflammationsreaktion werden wenige Ag-spezifische „Pionier“-T-Effektorzellen lokal durch Kontakt mit spezifischem Antigen aktiviert, induzieren eine starke Rekrutierung von T-Effektorzellen und lösen durch sekundäre Aktivierung von Inflammationsmediatoren effektiv eine Inflammation aus. Die Migration von T-Effektorzellen in der Frühphase einer T-Zell-abhängigen Inflammationsreaktion ist unabhängig von deren Ag-Spezifität. Eine Blockade der Migration von T-Effektorzellen lässt sich in geringem Ausmaß durch Blockade des wichtigen proinflammatorischen Mediators $TNF\alpha$ erreichen, wobei die Blockade einen stärkeren Einfluss auf die sekundären Effekte der Inflammationsreaktion, die Schwellung, ausübt, als auf die T-Effektorzell-Migration. Im Verlauf der Inflammationsreaktion kommt es zu einer ausgeprägten Akkumulation Ag-spezifischer T-Effektorzellen, die aus einer Population proliferierter Zellen besteht. Die zugrunde liegenden Mechanismen hierfür sind bisher unklar. Am wahrscheinlichsten ist jedoch eine lokale Proliferation Ag-spezifischer T-Effektorzellen nach Sekundärkontakt im peripheren Inflammationsherd.

7 Literaturverzeichnis

1. Igarashi, H., et al., *Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 117-30.
2. Allman, D., et al., *Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 168-74.
3. Montecino-Rodriguez, E., H. Min, and K. Dorshkind, *Reevaluating current models of thymic involution*. Semin Immunol, 2005. **17**(5): p. 356-361.
4. Jameson, S., *Maintaining the norm: T-cell homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**: p. 547-556.
5. Seder, R. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. Nat Immunol, 2003(4): p. 835-842.
6. Swain, S., et al., *Regulation of memory CD4 T cells: generation, localization and persistence*. Adv Exp Med Biol, 2002. **512**: p. 113-120.
7. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
8. Jenkins, M.K., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 23-45.
9. Itano, A. and M. Jenkins, *Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node*. Nat Immunol, 2003. **4**: p. 733-739.
10. Sixt, M., et al., *The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node*. Immunity, 2005(22): p. 19-29.
11. Croft, M., *Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?* Nat Rev Immunol, 2003(3): p. 609-620.
12. Jelley-Gibbs, D.M., et al., *Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5017-26.
13. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
14. Swain, S.L., et al., *From naive to memory T cells*. Immunol Rev, 1996. **150**: p. 143-67.
15. Lanzavecchia, A., G. Lezzi, and A. Viola, *From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior*. Cell, 1999. **96**(1): p. 1-4.
16. Sallusto, F., et al., *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 875-83.
17. Campbell, J.J. and E.C. Butcher, *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 336-41.
18. Dudda, J.C., J.C. Simon, and S. Martin, *Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 857-63.
19. Wynn, T.A., *T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1069-70.

20. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
21. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
22. Dong, C., *Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 329-33.
23. Lock, C., et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 500-8.
24. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
25. Albanesi, C., et al., *Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(1): p. 81-7.
26. Matusevicius, D., et al., *Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis*. Mult Scler, 1999. **5**(2): p. 101-4.
27. Grabovsky, V., O. Dwir, and R. Alon, *Endothelial chemokines destabilize L-selectin-mediated lymphocyte rolling without inducing selectin shedding*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20640-50.
28. Goodarzi, K., et al., *Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 965-73.
29. Butcher, E.C., et al., *Lymphocyte trafficking and regional immunity*. Adv Immunol, 1999. **72**: p. 209-53.
30. Mackay, C., *Lymphocyte migration. A new spin on lymphocyte homing*. Curr Biol, 1995. **5**(7): p. 733-6.
31. Adamson, P., et al., *Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2964-73.
32. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 867-78.
33. Vicente-Manzanares, M., et al., *The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions*. Int Rev Cytol, 2002. **216**: p. 233-89.
34. Gowans, J.L. and E.J. Knight, *The route of recirculation of lymphocytes in the rat*. Proceed. Roy. Soc. London, B, 1964. **159**: p. 257-282.
35. Lance, E.M. and R.N. Taub, *Segregation of lymphocyte populations through differential migration*. Nature, 1969. **221**(183): p. 841-3.
36. Cahill, R.N., et al., *Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes*. J Exp Med, 1977. **145**(2): p. 420-8.
37. Mackay, C.R., W.L. Marston, and L. Dudler, *Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation*. J. Exp. Med., 1990. **171**(3): p. 801-17.
38. Butcher, E.C., *The regulation of lymphocyte traffic*. Curr Top Microbiol. Immunol., 1986. **128** p. 85-122.

-
39. Masopust, D., et al., *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
 40. Hamann, A., et al., *Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(11): p. 3207-18.
 41. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
 42. Huehn, J., K. Siegmund, and A. Hamann, *Migration rules: functional properties of naive and effector/memory-like regulatory T cell subsets*. Curr Top Microbiol Immunol. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **293**: p. 89-114.
 43. Tang, H.L. and J.G. Cyster, *Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells* Science, 1999. **284**(5415): p. 819-22.
 44. Mackay, C.R., W. Marston, and L. Dudler, *Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge*. Eur. J. Immunol., 1992. **22**: p. 2205-2210.
 45. Smith, M.E., A.F. Martin, and W.L. Ford, *Migration of lymphoblasts in the rat*. Monogr. Allergy, 1980. **16**: p. 203-232.
 46. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. **296**(5566): p. 346-9.
 47. Brinkmann, V., et al., *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21453-7.
 48. Xie, J.H., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor agonism impairs the efficiency of the local immune response by altering trafficking of naive and antigen-activated CD4+ T cells*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3662-70.
 49. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
 50. Mora, J.R. and U.H. von Andrian, *T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges*. Trends Immunol, 2006. **27**(5): p. 235-43.
 51. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions* Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
 52. Agrewala, J.N., et al., *Unique ability of activated CD4+ T cells but not rested effectors to migrate to non-lymphoid sites in the absence of inflammation*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6106-15.
 53. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Exploring pathways for memory T cell generation*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 805-6.
 54. Campbell, D.J. and E.C. Butcher, *Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4+ T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 135-141.
 55. Homey, B., et al., *CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 157-65.
 56. Campbell, J.J., et al., *The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells*. Nature, 1999. **400**(6746): p. 776-80.

-
57. Campbell, J.J., D.J. O'Connell, and M.A. Wurbel, *Cutting Edge: Chemokine receptor CCR4 is necessary for antigen-driven cutaneous accumulation of CD4 T cells under physiological conditions*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3358-62.
 58. Hirata, T., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1669-76.
 59. Abitorabi, M.A., et al., *Differential expression of homing molecules on recirculating lymphocytes from sheep gut, peripheral, and lung lymph*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3111-7.
 60. Berlin, C., et al., *Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell, 1993. **74**(1): p. 185-95.
 61. Wagner, N., et al., *Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue*. Nature, 1996. **382**(6589): p. 366-70.
 62. Zabel, B.A., et al., *Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis*. J Exp Med, 1999. **190**(9): p. 1241-56.
 63. Kunkel, E.J., et al., *Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 761-8.
 64. Hamann, A., et al., *Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3282-93.
 65. Nakache, M., et al., *The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 179-81.
 66. Papadakis, K.A., et al., *The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5069-76.
 67. Mora, J.R., et al., *Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 88-93.
 68. Stagg, A.J., M.A. Kamm, and S.C. Knight, *Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin*. Eur J Immunol, 2002. **32**: p. 1445-1454.
 69. Iwata, M., et al., *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 527-38.
 70. Dudda, J.C., et al., *Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments*. Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1056-65.
 71. Sigmundsdottir, H., et al., *DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 285-93.
 72. Mora, J.R., et al., *Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells*. Science, 2006. **314**(5802): p. 1157-60.
 73. Mebius, R.E., *Vitamins in control of lymphocyte migration*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 229-30.

74. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin.* N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
75. Sprent, J., J.F. Miller, and G.F. Mitchell, *Antigen-induced selective recruitment of circulating lymphocytes.* Cell Immunol, 1971. **2**(2): p. 171-81.
76. Cahill, R.N., H. Frost, and Z. Trnka, *The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes.* J Exp Med, 1976. **143**(4): p. 870-88.
77. Cahill, R.N., et al., *Changing patterns of lymphocyte circulation during development.* Blood Cells, 1980. **6**(1): p. 35-40.
78. Sprent, J., *Migration and lifespan of lymphocytes, in B and T cells in immune response,* F. Loor and G.E. Roelants, Editors. 1977, John Wiley & Sons: Basel. p. 59-82.
79. Ager, A. and M.T. Drayson, *Lymphocyte migration in the rat, in Migration and homing of lymphoid cells,* A.J. Husband, Editor. 1988, CRC Press: Boca Raton. p. 19-49.
80. Arnold, C.N., E.C. Butcher, and D.J. Campbell, *Antigen-specific lymphocyte sequestration in lymphoid organs: lack of essential roles for alphaL and alpha4 integrin-dependent adhesion or Galphai protein-coupled receptor signaling.* J Immunol, 2004. **173**(2): p. 866-73.
81. Ford, W.L. and S.J. Simmonds, *The tempo of lymphocyte recirculation from blood to lymph in the rat.* Cell Tissue Kinet, 1972. **5**(2): p. 175-89.
82. Rowley, D.A., et al., *The specific selection of recirculating lymphocytes by antigen in normal and preimmunized rats.* J. Exp. Med., 1972. **136**: p. 499.
83. Bucy, R.P., et al., *Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues.* J Clin Invest, 1999. **103**(10): p. 1391-8.
84. Raine, C.S., et al., *Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination.* Lab Invest., 1990. **63**(4): p. 476-89.
85. Cannella, B., A.H. Cross, and C.S. Raine, *Adhesion-related molecules in the central nervous system. Upregulation correlates with inflammatory cell influx during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis.* Lab Invest., 1991. **65**(1): p. 23-31.
86. Cannella, B., A.H. Cross, and C.S. Raine, *Anti-adhesion molecule therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis.* J. Neuroimmunol, 1993. **46**(1-2): p. 43-55.
87. Roman, E., et al., *CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function.* J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 957-68.
88. Reinhardt, R.L., et al., *Preferential Accumulation of Antigen-specific Effector CD4 T Cells at an Antigen Injection Site Involves CD62E-dependent Migration but Not Local Proliferation.* J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 751-62.
89. Epperson, D.E. and J.S. Pober, *Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells.* J Immunol, 1994. **153**(12): p. 5402-12.
90. Pober, J.S., M.S. Kluger, and J.S. Schechner, *Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin.* Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 12-25.

-
91. Hughes, C.C., C.O. Savage, and J.S. Pober, *The endothelial cell as a regulator of T-cell function*. Immunol. Rev, 1990. **117**(85): p. 85-102.
 92. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
 93. Male, D., et al., *Lymphocyte migration into brain modelled in vitro: control by lymphocyte activation, cytokines, and antigen*. Cell Immunol., 1990. **127**(1): p. 1-11.
 94. Marelli-Berg, F.M., et al., *Antigen presentation by murine endothelial cells*. Transplant Proc, 2001. **33**(1-2): p. 315-6.
 95. Ager, A. and S. Mistry, *Interaction between lymphocytes and cultured high endothelial cells: an in vitro model of lymphocyte migration across high endothelial venule endothelium*. Eur. J. Immunol., 1988. **18**(8): p. 1265-74.
 96. Pober, J.S. and R.S. Cotran, *Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium*. Adv Immunol., 1991. **50**(261): p. 261-302.
 97. Choi, J., et al., *T lymphocyte-endothelial cell interactions*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 683-709.
 98. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination*. Nat Immunol, 2001. **2**(6): p. 487-92.
 99. Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian, *T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 154-9.
 100. Westermann, J., et al., *Naive, Effector, and Memory T Lymphocytes Efficiently Scan Dendritic Cells In Vivo: Contact Frequency in T Cell Zones of Secondary Lymphoid Organs Does Not Depend on LFA-1 Expression and Facilitates Survival of Effector T Cells*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2517-24.
 101. Cross, A.H., et al., *Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. I. Localization of 14C-labeled cells during acute, chronic, and relapsing experimental allergic encephalomyelitis*. Lab Invest., 1990. **63**(2): p. 162-70.
 102. Cross, A.H., V.K. Tuohy, and C.S. Raine, *Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination*. Cell Immunol, 1993. **146**(2): p. 261-9.
 103. Liu, C.P., et al., *Detection of glutamic acid decarboxylase-activated T cells with I-Ag7 tetramers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14596-601.
 104. McLachlan, J.B. and M.K. Jenkins, *Migration and accumulation of effector CD4+ T cells in nonlymphoid tissues*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(5): p. 439-42.
 105. Feuerer, M., et al., *Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1151-7.
 106. Kawakami, N., et al., *Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1805-14.
 107. Kaldjian, E.P., et al., *Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix*. Int Immunol, 2001. **13**(10): p. 1243-53.

108. Reinhardt, R.L., et al., *Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 101-5.
109. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(1): p. 6-15.
110. Hogan, R.J., et al., *Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1813-22.
111. Wiley, J.A., et al., *Antigen-specific CD8(+) T cells persist in the upper respiratory tract following influenza virus infection*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3293-9.
112. Palmer, D.C., et al., *Vaccine-stimulated, adoptively transferred CD8+ T cells traffic indiscriminately and ubiquitously while mediating specific tumor destruction*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7209-16.
113. Bromley, S.K., S.Y. Thomas, and A.D. Luster, *Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 895-901.
114. Debes, G.F., et al., *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 889-94.
115. Pharma, W., *Enbrel R Fachinfo*. 2007.
116. Avunduk, M.C., et al., *Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats*. Exp Eye Res, 2004. **79**(3): p. 357-65.
117. Christadoss, P. and E. Goluszko, *Treatment of experimental autoimmune myasthenia gravis with recombinant human tumor necrosis factor receptor Fc protein*. J Neuroimmunol, 2002. **122**(1-2): p. 186-90.
118. Murphy, K., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh, *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo*. Science, 1990. **250**: p. 1720-3.
119. Robertson, J.M., P.E. Jensen, and B.D. Evavold, *DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4706-12.
120. Ferreira, C., et al., *Differential survival of naive CD4 and CD8 T cells*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3689-94.
121. Lefrancois, L. and D. Masopust, *T cell immunity in lymphoid and non-lymphoid tissues*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(4): p. 503-8.
122. ten Berge, R.J., et al., *Labeling with indium-111 has detrimental effects on human lymphocytes: concise communication*. J Nucl Med, 1983. **24**(7): p. 615-20.
123. Butcher, E.C. and W.L. Ford, *Following cellular traffic: methods of labelling lymphocytes and other cells to trace their migration in vivo*, in *Handbook of experimental immunology*, D.M. Weir, Editor. 1986, Blackwell Scientific Publications: Oxford. p. 57.1-57.23.
124. Sparshott, S.M., et al., *Factors influencing the fate of 111indium-labelled lymphocytes after transfer to syngeneic rats*. J Immunol Methods, 1981. **41**(3): p. 303-20.
125. Botti, C., et al., *Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes*. Eur J Nucl Med, 1997. **24**(5): p. 497-504.
126. Kuyama, J., et al., *Indium-111 labelled lymphocytes: isotope distribution and cell division*. Eur J Nucl Med, 1997. **24**(5): p. 488-96.

-
127. Klugewitz, K., et al., *Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into the liver*. Hepatology, 2002. **35**: p. 568-578.
 128. Zhang, X., et al., *Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis*. J Exp Med, 1997. **185**(10): p. 1837-49.
 129. Sharma, V., M. Delgado, and D. Ganea, *Granzyme B, a new player in activation-induced cell death, is down-regulated by vasoactive intestinal peptide in Th2 but not Th1 effectors*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 97-110.
 130. Davidson, W.F., et al., *T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6218-30.
 131. Gorak-Stolinska, P., et al., *Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(5): p. 756-66.
 132. Siegel, R.M., et al., *Death receptor signaling and autoimmunity*. Immunol Res, 2003. **27**(2-3): p. 499-512.
 133. Watanabe, N., et al., *Th1 and Th2 subsets equally undergo Fas-dependent and -independent activation-induced cell death*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 1858-64.
 134. Varadhachary, A.S., et al., *Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5778-83.
 135. Scott, D.L. and G.H. Kingsley, *Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2006. **355**(7): p. 704-12.
 136. Gunzer, M., et al., *Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 622-9.
 137. Gunzer, M., et al., *Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 323-32.
 138. de Vos, A.F., et al., *Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5415-23.
 139. Vallance, B.A., et al., *T cell-mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II-deficient mice*. Gastroenterology, 1998. **115**(4): p. 978-87.
 140. Issekutz, T.B., *Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and in vivo lymphocyte migration in the rat*. J. Immunol., 1990. **144**(6): p. 2140-6.
 141. Konstantopoulos, K., et al., *Endothelial P-selectin and VCAM-1 each can function as primary adhesive mechanisms for T cells under conditions of flow*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(2): p. 179-87.
 142. Hwang, J.M., et al., *A critical temporal window for selectin-dependent CD4+ lymphocyte homing and initiation of late-phase inflammation in contact sensitivity*. J Exp Med, 2004. **199**(9): p. 1223-34.

-
143. Gotsch, U., et al., *Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo*. Cell Adhes Commun, 1994. **2**(1): p. 7-14.
 144. Collins, T., et al., *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers*. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 899-909.
 145. Van Loveren, H., S. Kraeuter-Kops, and P.W. Askenase, *Different mechanisms of release of vasoactive amines by mast cells occur in T cell-dependent compared to IgE-dependent cutaneous hypersensitivity responses*. Eur J Immunol, 1984. **14**(1): p. 40-7.
 146. van Loveren, H., R. Meade, and P.W. Askenase, *An early component of delayed-type hypersensitivity mediated by T cells and mast cells*. J Exp Med, 1983. **157**(5): p. 1604-17.
 147. Matsuda, H., et al., *Adoptive cell transfer of contact sensitivity-initiation mediated by nonimmune cells sensitized with monoclonal IgE antibodies. Dependence on host skin mast cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5080-92.
 148. Xu, J., et al., *Impaired primary T cell responses in L-selectin-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 589-98.
 149. Ptak, W., W.R. Herzog, and P.W. Askenase, *Delayed-type hypersensitivity initiation by early-acting cells that are antigen mismatched or MHC incompatible with late-acting, delayed-type hypersensitivity effector T cells*. J Immunol, 1991. **146**(2): p. 469-75.
 150. Ferreri, N.R., et al., *Induction of macrophage TNF alpha, IL-1, IL-6, and PGE2 production by DTH-initiating factors*. Cell Immunol, 1991. **137**(2): p. 389-405.
 151. McLachlan, J.B., et al., *Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1199-205.
 152. Milon, G., et al., *A delayed-type hypersensitivity reaction initiated by a single T lymphocyte*. Agents Actions, 1981. **11**(6-7): p. 612-4.
 153. Feuerer, M., et al., *Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2857-63.
 154. Austrup, F., et al., *P- and E-selectin mediate recruitment of T helper 1 but not T helper 2 cells into inflamed tissues*. Nature, 1997. **385**(6611): p. 81-83.
 155. Obst, R., et al., *Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4+ T cell response*. J. Exp. Med., 2005. **201**(10): p. 1555-1565.
 156. Mercado, R., et al., *Early programming of T cell populations responding to bacterial infection*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6833-9.
 157. van Stipdonk, M.J., E.E. Lemmens, and S.P. Schoenberger, *Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 423-9.
 158. Bevan, M.J. and P.J. Fink, *The CD8 response on autopilot*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 381-2.
 159. Biedermann, T., et al., *Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1441-52.
 160. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.

-
161. Van Loveren, H. and P.W. Askenase, *Delayed-type hypersensitivity is mediated by a sequence of two different T cell activities*. J Immunol, 1984. **133**(5): p. 2397-401.
 162. Marelli-Berg, F.M., et al., *Antigen recognition influences transendothelial migration of CD4+ T cells*. J Immunol, 1999. **162**(2): p. 696-703.
 163. Hirata, T., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1669-76.
 164. Karrar, A., et al., *Human liver sinusoidal endothelial cells induce apoptosis in activated T cells: a role in tolerance induction*. Gut, 2007. **56**(2): p. 243-52.
 165. Huang, L., et al., *The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo*. Immunity, 1994. **1**: p. 741-749.
 166. Klugewitz, K., et al., *Immunomodulatory effects of the liver: Deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of IFN- γ producing cells after intravenous protein immunization*. J Immunol, 2002. **169**: p. 2407-2413.
 167. Mehal, W.Z., A.E. Juedes, and I.N. Crispe, *Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3202-10.
 168. Bertolino, P., et al., *Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1063-71.
 169. Luettig, B., et al., *Naive and memory T lymphocytes migrate in comparable numbers through normal rat liver: activated T cells accumulate in the periportal field*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4300-7.
 170. Dini, L. and E.C. Carla, *Hepatic sinusoidal endothelium heterogeneity with respect to the recognition of apoptotic cells*. Exp Cell Res, 1998. **240**(2): p. 388-93.
 171. Mehal, W.Z., F. Azzaroli, and I.N. Crispe, *Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T cell apoptosis*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 667-73.

8 Danksagung

Ich danke Prof. Hamann für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung während der Durchführung der Arbeit. Mein Dank gilt insbesondere Dr. Uta Syrbe, die mich bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit unterstützt hat. Weiterhin danke ich Dr. Markus Feuerer, Dr. Jochen Hühn, Dr. Debis, Dr. Joachim Lehmann und Dr. Gudrun Doebes für konstruktive Vorschläge und rege Diskussionen. Weiterhin möchte ich Uta Haubold für die Unterstützung und Beratung in technischen Fragen und Dr. Huscher für die statistische Beratung danken.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner
A r b e i t n i c h t v e r ö f f e n t l i c h t .

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Saeed Ghani, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Antigen-spezifische Migration von T-Helferzellen im murinen Inflammationsmodell selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Kerstin Siegmund, Markus Feuerer, Christiane Siewert, Saeed Ghani, Uta Haubold, Anja Dankof, Veit Krenn, Michael P. Schön, Alexander Scheffold, John B. Lowe, Alf Hamann, Uta Syrbe, and Jochen Huehn: *Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo*. *Blood*, 2005. **106**: p. 3097-3104

Patrick Bertolino, Arnhild Schrage, David G. Bowen, Katja Klugewitz, Saeed Ghani, Katharina Eulenburg, Lauren Holz, Nancy Hogg, Geoffrey W. McCaughan, Alf Hamann: *Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice*. *Hepatology*, 2005. **42**(5): p. 1063-71

Kongressbeiträge

2005 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Kiel (V)

2003 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Berlin (P)

Poster (P), Vorträge(V)