

3. Ergebnisse

3.1. Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 auf T-Lymphozyten der intestinalen Mucosa und des peripheren Blutes

Rund 75% der untersuchten LPL-T-Zellen und ca. 90% der IEL-T-Zellen exprimierten CCR5 ($p < 0,05$). Demgegenüber waren knapp 20% der T-Zellen des peripheren Blutes CCR5-positiv (Tabelle 2). Die Unterschiede bei der CCR5-Expression im Vergleich von intestinalen mit peripheren T-Zellen waren signifikant ($p < 0,01$).

CXCR4 wurde von etwa 90% der LPL-T-Zellen exprimiert. Rund ein Drittel der IEL T-Zellen und etwa ein Viertel der peripheren T-Zellen waren CXCR4-positiv. Damit exprimierten LPL zu einem signifikant größerer Anteil CXCR4 als IEL und PBL ($p < 0,01$).

Tab. 2: Vergleich der Expression von CCR5 und CXCR4 auf CD3-positiven Zellen (T-Zellen) der intestinalen Mukosa (LPL, IEL) und des peripheren Blutes (PBL), sowie Co-Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 mit Markern der T-Zellaktivierung und T-Zelldifferenzierung

	LPL	IEL	PBL
Marker	% (Spannweite)	% (Spannweite)	% (Spannweite)
CCR5 ⁺ /CD3 ⁺	73 (57-99) ^{#†}	89 (72-97) [‡]	19 (1-26)
CXCR4 ⁺ /CD3 ⁺	91 (73-98) ^{#†}	37 (0-92)	27 (2-36)
CD4⁺	71 (37-88)	42 (22-82)	78 (72-83)
CCR5 ⁺ /CD4 ⁺	66 (44-99) ^{#§}	83 (21-97) [‡]	11 (1-16)
CXCR4 ⁺ /CD4 ⁺	89 (72-98) ^{#†§}	38 (1-92) ^{‡§}	14 (0-15)
CD8⁺	34 (25-82)	62 (34-68)	21 (11-25)
CCR5 ⁺ /CD8 ⁺	90 (76-100) [#]	93 (36-98) [‡]	47 (7-68)
CXCR4 ⁺ /CD8 ⁺	83 (46-98) ^{#†}	24 (0-84)	11 (1-17)
TCR$\gamma$$\delta$⁺	7 (4-9,5)	6 (3-47)	5 (4-5,5)
CCR5 ⁺ /TCR γ δ ⁺	78 (57-99) [#]	91 (47-98) [‡]	34 (6-56) [*]
CXCR4 ⁺ /TCR γ δ ⁺	86 (46-96) ^{#†*}	36 (0-91) [*]	9 (2-22)

Tab. 2 (Fortsetzung)

	LPL	IEL	PBL
Marker	% (Spannweite)	% (Spannweite)	% (Spannweite)
CD45R0	97 (91-100)	97 (83-100)	79 (54-91)
CCR5 ⁺ /CD45R0 ⁺	74 (58-99) ^{#*}	87 (41-97) ^{‡*}	22 (1-24)
CXCR4 ⁺ /CD45R0 ⁺	88 (66-98) ^{#†*}	39 (0-92)	12 (2-26)
CD103	31 (19-98)	78 (37-95)	n.b.
CCR5 ⁺ /CD103 ⁺	90 (74-100) [*]	96 (45-98) [*]	n.b.
CXCR4 ⁺ /CD103 ⁺	90 (64-98) ^{†*}	29 (0-96) [*]	n.b.
CD25	16 (3-44)	3 (0-6)	29 (18-35)
CCR5 ⁺ /CD25 ⁺	70 (43-99) ^{#*}	87 (0-100) [‡]	14 (0-18)
CXCR4 ⁺ /CD25 ⁺	87 (48-99) ^{#†}	38 (0-96)	10 (1-21)
CD69	93 (66-100)	98 (83-100)	18 (11-21)
CCR5 ⁺ /CD69 ⁺	73 (59-99) ^{#*}	89 (43-97) ^{‡*}	22 (1-54) [*]
CXCR4 ⁺ /CD69 ⁺	89 (56-98) ^{#†}	37 (0-94)	40 (8-59) [*]
HLA-DR	14 (2-43)	4 (0-14)	9.5 (5-11)
CCR5 ⁺ /HLA-DR ⁺	79 (68-100) ^{#*}	85 (0-98)	57 (1-63) [*]
CXCR4 ⁺ /HLA-DR ⁺	91 (72-99) ^{#†}	53 (0-94)	21 (2-29)

Angegeben sind Median und Spannweite der Mittelwerte aus den Einzelexperimenten.

= p<0,01 im Vergleich von LPL zu PBL

† = p<0,05 im Vergleich von LPL zu IEL

‡ = p<0,05 im Vergleich von IEL zu PBL

§ = p<0,05 im Vergleich von CD4-/ CD8-T-Zellen

* = p<0,05 im Vergleich von T-Zell-Aktivierungs- bzw. Differenzierungsmarker- positiven gegenüber -negativen Subpopulationen

n.b. = nicht bestimmt.

3.2. Expression von CCR5 und CXCR4 auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen

Zwei Drittel der CD4-positiven LPL-T-Zellen und über 80% der CD4-positiven IEL-T-Zellen exprimierten CCR5, gegenüber rund 10% der CD4-Zellen des peripheren Blutes.

CXCR4 war auf knapp 90% der CD4-positiven LPL exprimiert. CD4-positive IEL exprimierten zu knapp 40% CXCR4, CD4-positive PBL waren zu 14% CXCR4-positiv. Beide Chemokinrezeptoren waren auf intestinalen CD4-Zellen zu einem signifikant höheren Anteil exprimiert als auf peripheren CD4-T-Zellen ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ für die CXCR4-Expression auf IEL). Abbildung 3 zeigt die Chemokinrezeptorexpression auf CD4-T-Zellen eines jeweils repräsentativen Probanden.

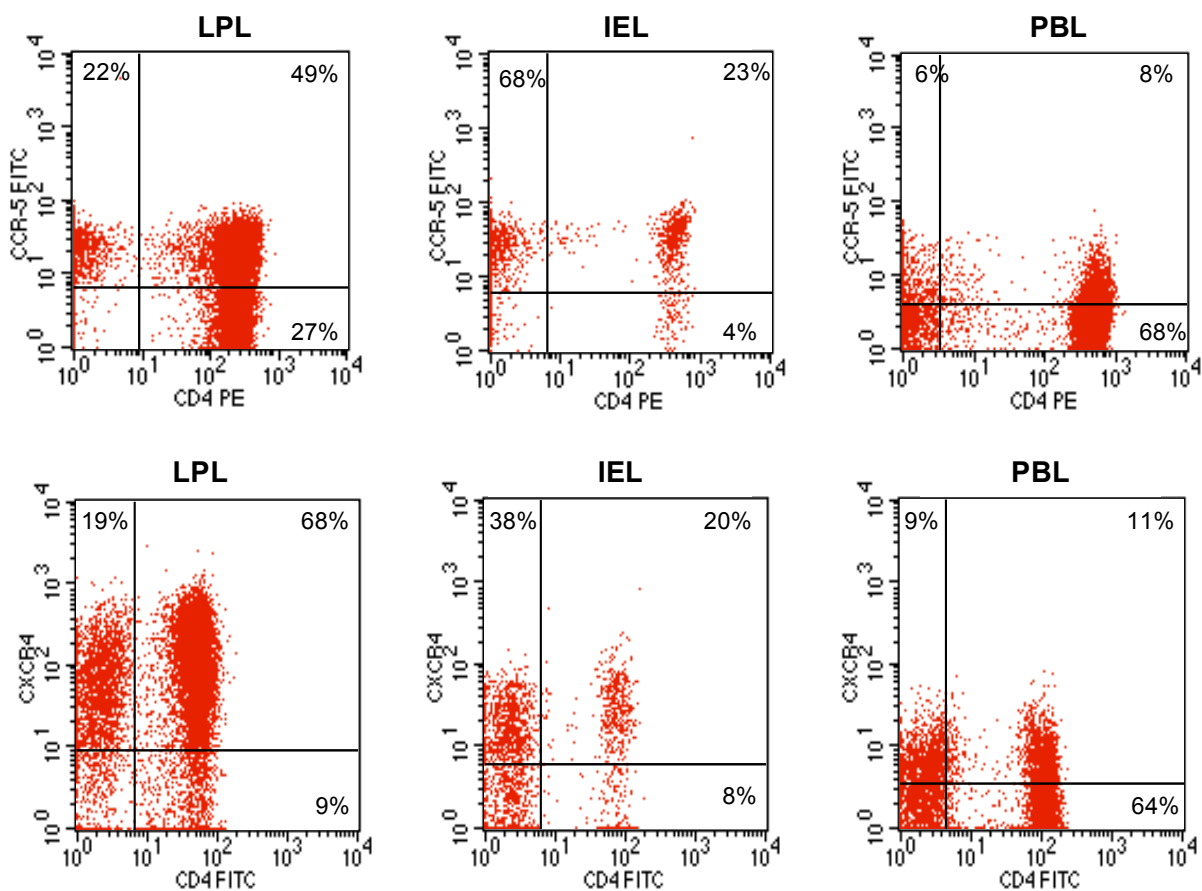


Abb.3: Fluoreszenzzytometrische-Analyse der Expression von CCR5 und CXCR4 auf CD4-positiven T-Zellen der intestinalen Mukosa (IEL, LPL) und des peripheren Blutes (PBL). Dargestellt ist die Analyse eines jeweils repräsentativen Probanden für intestinale bzw. für periphere Lymphozyten. Die Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der analysierten Zellen im jeweiligen Quadranten. Die Quadrantenmarkierung wurde durch Abgleich mit einer Negativkontrolle festgelegt. Die isolierten Lymphozyten wurden mit Cy-5-konjugierten anti-CD3-Antikörpern, mit FITC- bzw. PE- konjugierten anti-CD4-, sowie mit FITC- konjugierten anti-CCR5-Antikörpern und PE- konjugierten anti-CXCR4-Antikörpern gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels Dreikanal-Fluoreszenzzytometrie.

In Abbildung 3 erkennt man, dass bei den intestinalen chemokinrezeptorpositiven T-Zellen jeweils zwei Subpopulationen deutlich voneinander abgrenzbar sind; eine davon CD4-positiv (rechter oberer Quadrant), die andere CD4- negativ (linker oberer Quadrant). Für PBL lässt sich eine solche klare Abgrenzung nicht feststellen. In Abbildung 4 ist der Median der Mittelwerte aus den Ergebnissen jedes einzelnen Probanden durch ein Symbol dargestellt.

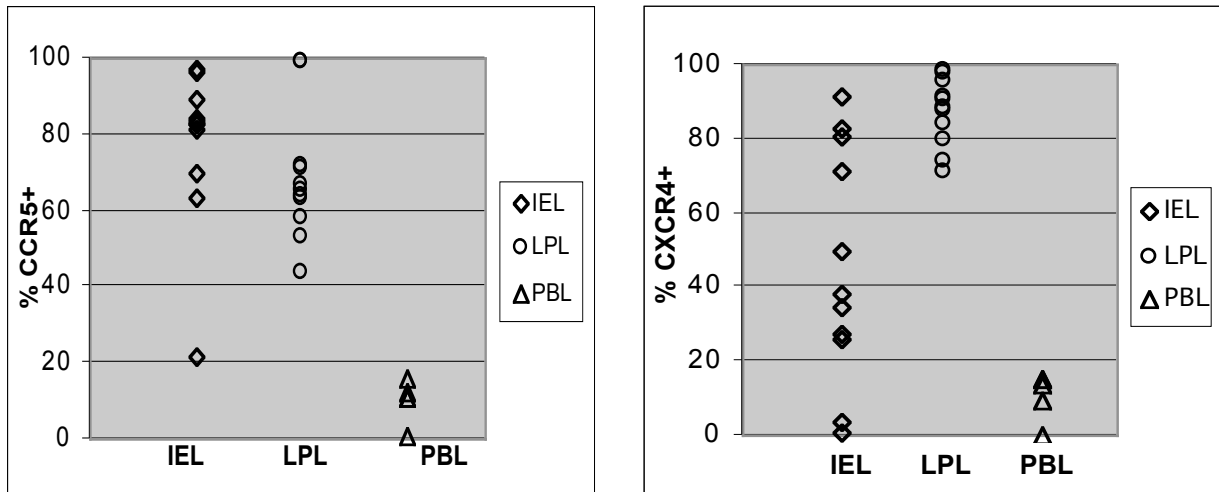


Abb. 4: Vergleich der prozentualen Expression von CCR5 (links) und CXCR4 (rechts) auf CD4-positiven T-Zellen der intestinalen Mukosa (linke und mittlere Kolumne) und des peripheren Blutes (rechte Kolumne). Jedes Symbol steht für den Median der Mittelwerte aus der Zellanalyse eines Probanden. Untersucht wurden intestinale Lymphozyten aus makroskopisch blanden Anteilen von 11 Darmresektaten (fünf Dünndarm- und sechs Dickdarmresektate), sowie periphere Lymphozyten von fünf klinisch gesunden Probanden. Die Unterschiede in der Expression von CCR5 und CXCR4 auf intestinalen im Vergleich zu peripheren CD4-Zellen waren signifikant ($p < 0,05$ für die CXCR4-Expression auf IEL).

CD8-positive LPL und IEL waren jeweils zu rund 90% CCR5-positiv. Die CCR5-Expression auf CD8-positiven PBL lag bei rund 45% und war somit signifikant geringer als auf den intestinalen CD8-T-Zellen ($p < 0,01$).

CD8-positive LPL exprimierten in etwa gleichviel CXCR4 wie CCR5. CD8-positive IEL waren demgegenüber nur zu rund einem Viertel CXCR4 positiv, CD8-positive PBL nur zu ca. 10%. Der Anteil CXCR4-positiver LPL war bei den CD8-T-Zellen signifikant größer als bei CD8-positiven IEL ($p < 0,05$) und PBL ($p < 0,01$).

Im Vergleich von CD4- zu CD8-positiven T-Zellen überwog bei den CD8-positiven LPL die CCR5-Expression ($p < 0,01$). Bei IEL ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der CCR5-Expression im Vergleich von CD4 -und CD8-T-Zellen.

CXCR4 war auf CD4-positiven LPL und IEL jeweils signifikant stärker exprimiert als auf der CD8-positiven Vergleichspopulation ($p < 0,05$ für LPL, $p < 0,01$ für IEL).

Bei den PBL unterschieden sich weder CCR5 noch CXCR4-Expression signifikant auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen.

3.3 Expression von CCR5 und CXCR4 auf TCR $\gamma\delta$ - und TCR $\alpha\beta$ -positiven T-Zellen

Von den TCR $\gamma\delta$ -positiven LPL exprimierten rund 80% CCR5 gegenüber rund 90% der IEL. TCR $\gamma\delta$ -positive PBL waren zu rund einem Drittel CCR5-positiv. Der Unterschied in der CCR5-Expression zwischen intestinalen und peripheren TCR $\gamma\delta$ -T-Zellen war signifikant ($p < 0,01$).

TCR $\gamma\delta$ -positive LPL waren zu rund 85% CXCR4-positiv, wohingegen die Expression auf TCR $\gamma\delta$ -positiven IEL (36%) und PBL (9%) im Vergleich signifikant geringer war ($p < 0,05$ für IEL bzw. $p < 0,01$ für PBL).

Verglich man die Expression auf TCR $\gamma\delta$ -positiven Zellen mit TCR $\gamma\delta$ -negativen Zellen, welche im wesentlichen einer TCR $\alpha\beta$ -positiven Zellpopulation entsprechen, so war CCR5 bei den PBL signifikant stärker auf der TCR $\gamma\delta$ -positiven Zellpopulation exprimiert ($p < 0,05$), für LPL und IEL ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt).

TCR $\gamma\delta$ -positive IEL und LPL waren zu einem geringeren Anteil CXCR4-positiv als TCR $\alpha\beta$ -positiven intestinale T-Lymphozyten ($p < 0,05$). Für PBL ergab sich kein Unterschied bei der CXCR4-Expression in Abhängigkeit von der Art des T-Zellrezeptors.

3.4. Co-Expression von CCR5 und CXCR4 mit Markern der T-Zell Differenzierung

3.4.1. CD45R0

Rund 75% der LPL, knapp 90% der IEL und 22% der PBL waren CCR5 positiv.

CD45R0-positive PBL exprimierten somit signifikant weniger CCR5 als LPL und IEL

($p < 0,01$). Betrachtete man vergleichend die CD45R0-negativen T-Zellen, so waren nur 36% der LPL, 58% der IEL und 4% der PBL CCR5-positiv (signifikant für LPL, $p < 0,01$ und IEL, $p < 0,05$).

CXCR4 wurde auf rund 90% der LPL und knapp 40% der IEL exprimiert, 12% der PBL waren CXCR4-positiv. Der Unterschied zwischen LPL und IEL bzw. PBL war signifikant ($p < 0,01$ für PBL und $p < 0,05$ für IEL). CXCR4 wurde vermehrt auf CD45R0-negativen T-Zellen exprimiert (signifikant für LPL, $p < 0,01$).

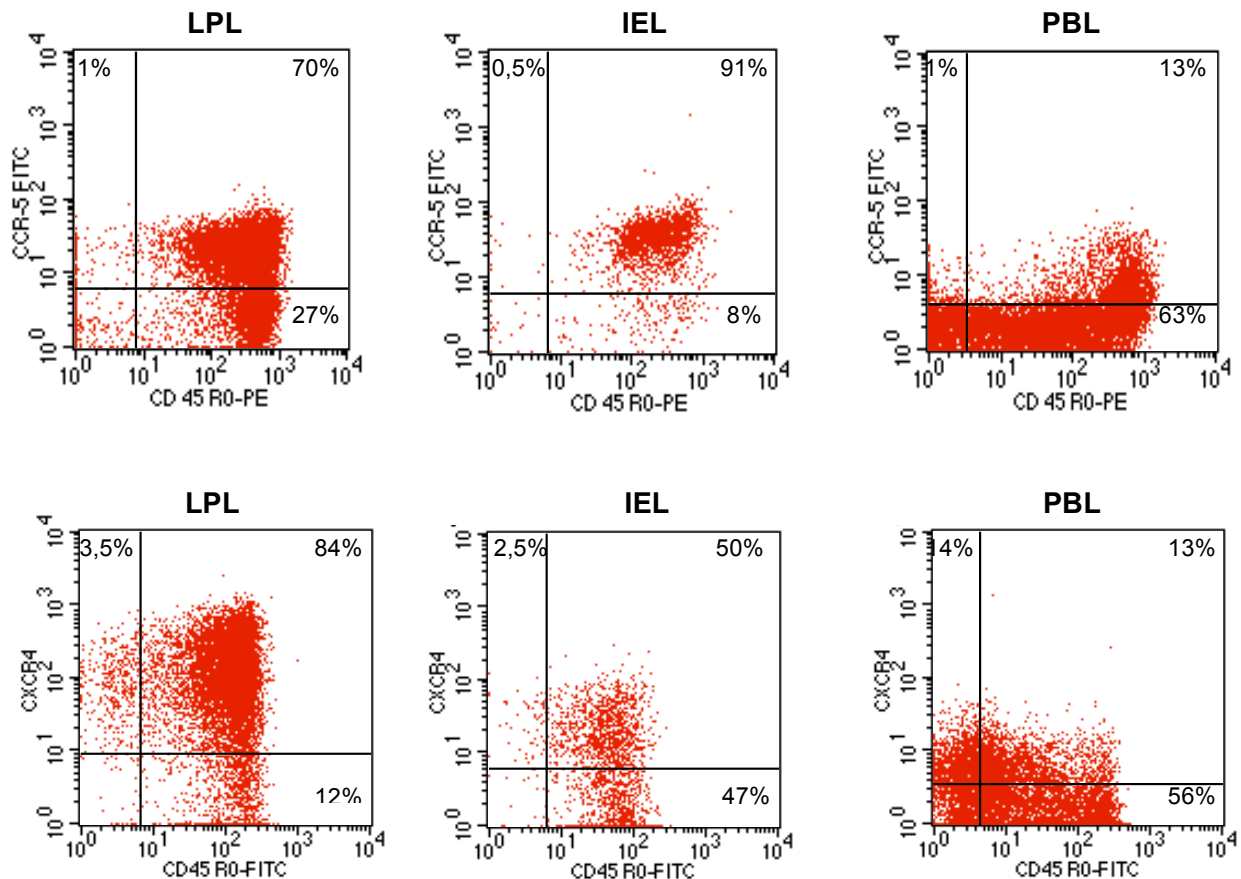


Abb. 5: Dreikanal-Fluoreszenzzytometrische Analyse der Expression von CCR5 (obere Reihe) und CXCR4 (untere Reihe) auf CD45R0-positiven IEL-, LPL- und PBL-T-Zellen. Dargestellt ist die Analyse eines jeweils repräsentativen Probanden. Die Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der untersuchten Zellen im jeweiligen Quadranten. Die isolierten Lymphozyten wurden mit Cy-5-konjugierten anti-CD3-Antikörpern, mit FITC- bzw. PE-markierten anti-CD45R0-, sowie mit FITC-markierten anti-CCR5-Antikörpern und PE-markierten anti-CXCR4-Antikörpern gefärbt.

3.4.2 CD103

CD103-positive IEL- und LPL-T-Zellen waren jeweils nahezu vollständig CCR5 positiv. Demgegenüber waren nur 64% der CD103-negativen LPL und 74% der IEL CCR5-positiv ($p < 0,01$).

CXCR4 fand sich auf 90% aller LPL gegenüber knapp 30% der IEL ($p < 0,01$).

95% der CD103-negativen LPL und 69% der IEL exprimierten CXCR4 ($p < 0,05$ für LPL, $p < 0,01$ für IEL). Die CD103-Expression auf PBL wurde nicht untersucht.

3.5. Co-Expression von CCR5 und CXCR4 mit Markern der T-Zellaktivierung

3.5.1. CD25

CD25 wurde nur auf einem geringen Prozentsatz der intestinalen T-Lymphozyten exprimiert.

Die Expression von CCR5 und CXCR4 entsprach dabei auf CD25-positiven LPL, IEL und PBL den an der Gesamtpopulation der CD3-positiven Zellen beobachteten Verteilungsverhältnissen.

Verglich man die CD25-positive mit der CD25-negativen T-Zellpopulation, so fand sich bei den LPL eine Mehrexpression von CCR5 in der CD25-negativen Population ($p < 0,05$). Darüber hinaus fand sich kein Unterschied in der Expression der Chemokinrezeptoren im Vergleich von CD25-positiven und CD25-negativen T-Zellen.

3.5.2. CD69

LPL und IEL waren zu über 90% CD69-positiv. PBL waren zu rund 20% CD69-positiv. Rund 20% aller CD69-positiven PBL exprimierten CCR5. Die CCR5 Expression auf CD69-positiven PBL war somit signifikant geringer ausgeprägt als auf LPL und IEL ($p < 0,01$).

Bei den CD69-negativen T-Zellen fand sich eine CCR5-Expression nur bei 27% der LPL, 33% IEL und 14% der CD69-negativen PBL. CCR5 war somit in allen drei Zellgruppen signifikant stärker auf CD69-positiven gegenüber CD69-negativen T-Zellen exprimiert ($p < 0,01$ für intestinale T-Zellen, $p < 0,05$ für PBL).

Für CXCR4 ließ sich ein Unterschied in der Expression auf CD69-positiven gegenüber CD69-negativen T-Zellen nur für PBL belegen: 40% der CD69-positiven PBL exprimierten CCR5 gegenüber 20% der CD69-negativen ($p < 0,05$).

3.5.3. HLA-DR

Nur ein geringer Teil der untersuchten intestinalen und peripheren T-Zellen war HLA-DR positiv. HLA-DR-positive LPL und PBL T-Zellen exprimierten gegenüber HLA-DR-negativen T-Zellen vermehrt CCR5 ($p < 0,05$). Für CXCR4 fand sich kein Unterschied in Bezug auf die Expression auf HLA-DR-positiven und HLA-DR negativen T-Zellen.