

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie der Charité,  
Universitätsklinik der Humboldt-Universität zu Berlin

Eingereicht über das  
Institut für Immunologie und Molekularbiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

## **Chemotaxis von T-Zellsubpopulationen *ex vivo***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Gudrun Debes  
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2002

Journal-Nr. 2669

gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M.F.G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M.F.G. Schmidt

Zweiter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. A. Hamann

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. E. Schein

Tag der Promotion: 17.12.2002

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
1.1. Das immunologische Gedächtnis und Effektor/Memory T-Zell-Konzepte .....	5
1.2. Das Th1/Th2-Modell und seine Bedeutung für Krankheit und Immunität .....	8
1.2.1 Die pathogenetische Rolle von Th1-und Th2-Zellen.....	10
1.3. Die Rezirkulation von Lymphozyten: das Mehrschrittmodell.....	10
1.3.1. die Adhäsionsmoleküle: Selektine, Integrine und ihre Liganden .....	12
1.3.2. Die Familie der Chemokine (und Chemokinrezeptoren).....	14
1.3.3. Einteilung von Chemokinen.....	15
1.3.4. Chemokinrezeptoren.....	16
1.3.5. Chemokin-Evolution .....	17
1.3.6. Chemokine in Entwicklung und Homöostase .....	20
1.3.6.1 Thymus .....	20
1.3.6.2 Hämatopoese/ Knochenmark und andere nicht-lymphatische Organsysteme .....	20
1.3.6.3 Sekundäre lymphatische Organe .....	21
1.3.7. Chemokine und Infektion.....	25
1.3.8. Organ- bzw. subpopulationsspezifisches Homing von T-Zellen .....	26
1.3.9. Chemokine im Krankheitsgeschehen.....	30
<b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>35</b>
3.1. Material.....	35
3.1.1. Antikörper .....	35
3.1.1.1. Antikörper in Zellkultur bzw. Zellisolation.....	35
3.1.1.2. Färbeantikörper für die Durchflusszytometrie (FACS) .....	36
3.1.2. Rekombinante Cytokine und Chemokine .....	37

3.1.3. Material für zellbiologische Arbeiten .....	38
3.1.4. Material für Färbungen, Immunisierungen, Chemotaxisassay, etc. ....	39
3.1.5. Medien und Puffer.....	39
3.1.6. Versuchstiere.....	40
3.2. Methoden .....	40
3.2.1. Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin.....	40
3.2.2. Induktion einer Hautentzündung.....	41
3.2.3. Isolation mononukleärer Zellen aus der Maus.....	41
3.2.4. Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Blut .....	42
3.2.5. Isolation mononukleärer Zellen aus murinem Blut.....	42
3.2.6. Anreicherung und Selektion verschiedener Lymphozytenpopulationen.....	42
3.2.5.1. Panning .....	43
3.2.6.2. Magnetische Zellsortierung (MACS <sup>®</sup> ).....	43
3.2.6.3. Zellisolation für Chemotaxisassays.....	44
3.2.7. Zellkultur .....	44
3.2.7.1. Th1- und Th2-Kultur .....	44
3.2.7.2 Kultivierung von Schneider-2-TARC Insektenzellen.....	45
3.2.7.3 Einfrieren von Zellen .....	46
3.2.8. FACS-Färbung und -Analyse .....	46
3.2.8.1 Oberflächenfärbung.....	46
3.2.8.2. Stimulation mit PMA/Ionomycin und intrazelluläre Färbung von Zytokinen.....	47
3.2.8.3. Detektion von Oberflächen-CCR7 kombiniert mit intrazellulärer Zytokinfärbung .....	47
3.2.8.4. Messung und Analyse .....	48
3.2.9. Chemotaxisassay.....	49
3.2.9.1 Quantifizierung.....	50

3.2.10. Homing-Assay .....	51
3.2.11. Grafische Darstellung und Statistik.....	52
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>53</b>
4.1. Migration zu konstitutiv exprimierten (homöostatischen) Chemokinen .....	53
4.1.1. Bestimmung der optimalen Konzentration.....	53
4.1.2. Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR5.....	54
4.1.3. Migration zu konstitutiv exprimierten Chemokinen in Homöostase und nach Immunisierung.....	54
4.1.4. Effekt der Immunisierung.....	56
4.1.5. Migration aktivierter und ruhender naiver oder Memory T-Zellen zu CCR7-Liganden.....	57
4.1.4. Migration von murinen zytokinproduzierenden (Effektor/Memory) T-Zellsubpopulationen zu CCL21, CXCL12 und CXCL13 in Homöostase und nach Immunisierung.....	60
4.1.5. Ist CCR7 der verantwortliche Rezeptor für die Chemotaxis von Effektor/Memory.....	65
T-Zellen zu CCL21? .....	65
4.1.6. Migration <i>in vitro</i> polarisierter Th1- und Th2-Zellen zu CCL21 und Expression des korrespondierenden Rezeptors CCR7 .....	68
4.1.6. Vergleich der Migration von Zytokinproduzenten aus Blut und Milz zu CCL21.....	69
4.1.7. Migrationsprofil zytokinproduzierender T-Zellen aus humanem Blut zu CCL19 .....	71
4.1.8. Expressionshöhe von CCR7 auf naiven und Effektor/Memory T-Zellen.....	73
4.1.9. Ist die Einwanderung von Effektorzellen in entzündetes Gewebe abhängig von CCR7? .....	76
4.2. Migration zu induzierbaren (inflammatorischen) Chemokinen in Homöostase und nach Immunisierung .....	77
4.2.1. Bestimmung der optimalen Konzentration.....	78
4.2.2. Migration von murinen zytokinproduzierenden (Effektor/Memory) T-Zellsubpopulationen zu CXCL9 und CCL17 in Homöostase und nach Immunisierung.....	81
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
5.1. Migrationsverhalten von naiven, aktivierten und Effektor/Memory T-Zellen.....	85

<b>5.1.1. Chemotaxis von naiven, aktivierten und Effektor/Memory T-Zellen zu homöostatisch exprimierten Chemokinen.....</b>	<b>86</b>
<b>5.1.2. Effektor/Memory T-Zellen und CCR7.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1.3. Die potentielle Bedeutung der Chemotaxis von Effektor/Memory T-Zellen zu homöostatischen/konstitutiv exprimierten Chemokinen.....</b>	<b>92</b>
<b>5.2. T-Zell-subpopulationsspezifisches Homing .....</b>	<b>96</b>
<b>5.2.1. Subpopulationsspezifische Migration zu in lymphatischen Organen exprimierten Chemokinen .....</b>	<b>96</b>
<b>5.2.2. T-Zell-subpopulationsspezifische Migration zu potentiell in Entzündung exprimierten Chemokinen .....</b>	<b>99</b>
<b>5.3. Schlussfolgerung .....</b>	<b>105</b>
<b>6.1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>108</b>
<b>6.2. SUMMARY .....</b>	<b>109</b>
<b>7. REFERENZEN.....</b>	<b>111</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>129</b>
<b>9. TABELLENANHANG .....</b>	<b>132</b>
<b>10. PUBLIKATIONEN UND KONGREßBEITRÄGE.....</b>	<b>141</b>
<b>11. DANKSAGUNG.....</b>	<b>142</b>
<b>12. ERKLÄRUNG .....</b>	<b>143</b>
<b>13. LEBENSLAUF.....</b>	<b>144</b>

## 10. Publikationen und Kongreßbeiträge

### Publikationen von Teilen der Arbeit in

1. Debes, G. F., U. E. Höpken and A. Hamann. 2002. In vivo differentiated cytokine-producing CD4<sup>+</sup> T cells express functional CCR7. *The Journal of Immunology*. 168:5441-5447.
2. Hauser, A. E., G. F. Debes, S. Arce, G. Cassese, A. Hamann, A. Radbruch and R. A. Manz. 2002. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *The Journal of Immunology*. 169:1277-1282.

### Kongreßbeiträge

mit dem Titel:

„Chemokine responsiveness of *in vivo* generated CD4<sup>+</sup> effector/memory T cells“

1. Poster- und Vortragspräsentation (23. - 27.06.2002) auf der „14<sup>th</sup> international conference on lymphatic tissues and germinal centres in immune reactions“ in Groningen, Holland
2. Posterpräsentation (28.11. - 01.12.2001) auf der „Cell Migration in Development and Disease“-Konferenz in Berlin Buch.
3. Poster- und Vortragspräsentation (22. - 27.07.2001) auf dem „11<sup>th</sup> International Congress of Immunology“ in Stockholm, Schweden
4. Vortragspräsentation (20. - 21.06.2001) auf dem Th1-/Th2-Workshop in Marburg
5. Vortragspräsentation (21. - 24.02.2001) auf der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Innsbruck, Österreich.

## 11. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Alf Hamann danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung innerhalb aller Phasen der Dissertationszeit.

Herrn Professor Schmidt möchte ich hiermit herzlich danken die Vertretung der Doktorarbeit im Fachbereich und alle damit verbundenen Arbeiten übernommen zu haben.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hamann und des DRFZ, die immer für eine nette kollegiale Stimmung im Labor gesorgt haben.

Heidi, Heidi und Tuula danke ich für ihre Unterstützung in der Zellkultur und bei Antikörperproblemen.

Ganz besonderer Dank gebührt den Korrekturlesern der Arbeit, Monika Markert und Nina Heegemann.

Ich danke auch ganz besonders Dörte Huscher für ihre Hilfe mit Statistik sowie S-Plus-Graphen und Uta Höpken für die gute Zusammenarbeit!

Wahrscheinlich schulde ich den allergrößten Dank Kerstin Bonhagen für ihre seelische Unterstützung in Höhen und Tiefen, aber auch den anderen „Mädels“, Azita, Lydia, Ana und Wiebke, die immer für mich da waren.

Einen ganz lieben Dank an meine Familie, besonders an Marina & Andreas, die immer an mich geglaubt haben.

## **12. Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Hilfe, nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe.

Gudrun Debes

### 13. Lebenslauf

Name: Debes  
Vornamen: Gudrun Philomena Fiona Nofretete  
Adresse: Beerenstr. 24, 14163 Berlin

Geburtsdatum: 13.06.1973  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig

Schulausbildung: 1979-1983 Grundschule Wegenkamp, Hamburg  
1983-1990 Albrecht-Thaer-Gymnasium, Hamburg  
1990-1993 Jahnschule, Hamburg, Abschluß mit der  
allgemeinen Hochschulreife

Studium: Veterinärmedizin  
  
1993 - 1996, Tierärztliche Hochschule Hannover  
1996 - 1998, Freie Universität Berlin, Abschluß mit  
dem Staatsexamen Veterinärmedizin,  
tierärztliche Approbation

Promotion: Beginn im Mai 1999 bei Prof. Dr. Alf Hamann in der  
Experimentellen Rheumatologie, Klinik mit Schwerpunkt  
Rheumatologie, Charité, Humboldt-Universität  
zu Berlin

Dissertationsthema „Chemotaxis von T-Zellsubpopulationen *ex vivo*“