

1. Einleitung

Das Immunsystem hat die Aufgabe Pathogene und entartete Zellen effizient zu eliminieren. Dabei muss es die schwierige Aufgabe bewältigen, zwischen „eigen“ und „fremd“ bzw. „gefährlich“ und „ungefährlich“ zu unterscheiden. Es gibt die angeborene und die adaptive Immunantwort. Bei der angeborenen Immunantwort, die beispielsweise von Granulozyten, Makrophagen, Komplement vermittelt wird, werden typische Eigenschaften von Eindringlingen (z.B. bakterielle Oberflächenstrukturen) erkannt, die dann beteiligte Zellen und Komponenten aktivieren. Bei der adaptiven Immunantwort erkennt ein T- oder B-Lymphozyt eine Spezifität dessen spezielles Antigen (Ag) und reagiert darauf, wobei einer von 10^5 Lymphozyten spezifisch für ein spezielles Ag ist. Dieser Teil des Immunsystems ist in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis gegen das betreffende Ag zu entwickeln, wodurch bei erneuter Infektion gegen das Ag noch schneller vorgegangen werden kann bzw. ein Eindringen verhindert wird.

Um innerhalb kürzester Zeit Eindringlinge und entartete Zellen erkennen und eliminieren zu können, zirkulieren Immunzellen kontinuierlich durch den Körper.

1.1. Das immunologische Gedächtnis und Effektor/Memory T-Zell-Konzepte

Spezialisierte Zellen, wie Memory-T- und B-Zellen, sowie langlebige Effektor-B-Zellen, die konstitutiv hoch affine Ak sezernieren (humorale Immunantwort durch Plasmazellen), bilden die Basis des immunologischen Gedächtnisses. Bei T-Zellen unterscheidet man bei Ag-erfahrenen Zellen, im Gegensatz zu Ag-unerfahrenen naiven Zellen, grundsätzlich zwischen Effektor- und Memory T-Zellen, wobei beide dem Memorykompartiment zugeordnet werden. In der Theorie geht man davon aus, dass Effektorzellen zum Betrachtungszeitpunkt ihre Effektorfunktionen erfüllen, Memory T-Zellen sich hingegen im Ruhezustand befinden („resting“).

Das Memory T-Zellkompartiment besteht aus $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die schneller als naive T-Zellen Effektorfunktionen erlangen, um infizierte Zellen zu töten und/oder inflammatorische Zytokine zu produzieren, welche das Pathogen an seiner Vermehrung hindern. Effektor $CD4^+$ T-Zellen geben zusätzlich B-Zell-Hilfe und verstärken die $CD8^+$ T-

Zelldifferenzierung durch Aktivierung von Ag-präsentierenden Zellen (APC) oder Zytokinsekretion von z.B. Interleukin- (IL) 2, IL-4 und IL-5.

In manchen Situationen wird protektive Immunität nur durch einen Arm des Immunsystems, wie z.B. durch Antikörper (Ak) oder CD8⁺ T-Zellen, vermittelt; doch für eine optimale Erregerabwehr müssen humorale und zelluläre Immunantwort mobilisiert werden.

Eine Gedächtnisantwort durch CD4⁺ oder CD8⁺-T-Zellen ist schneller und aggressiver als eine primäre Immunantwort. Zusammen mit der Ak-Antwort kann so ein eindringendes Pathogen schnell komplett eliminiert werden.

Merkmale von Memory-T-Zellen

Memory T-Zellen zeichnen sich durch eine Reihe von Merkmalen aus:

Durch die sogenannte klonale Expansion nimmt während der Erstinfektion die Frequenz einer Ag-spezifischen T-Zelle um den Faktor 1000 zu (1-4).

Während eine T-Zelle von der naiven zur Memory T-Zelle differenziert, ändert sich ihr Genexpressionsprofil durch Veränderungen in der Chromatinstruktur und das Profil aktiver Transkriptionsfaktoren. Es werden z.B. von Memory T-Zellen Gene, die für Interferon- γ (IFN- γ), IL-4 oder für zytotoxische Moleküle, wie Perforin/Granzym, kodieren und nicht von naiven T-Zellen exprimiert werden, teilweise konstitutiv angeschaltet (5).

Des Weiteren exprimieren Memory T-Zellen eine Reihe von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren, die ihnen die Extravasation in periphere Gewebe und Entzündungsgebiete ermöglichen. Naive T-Zellen sind hingegen nur mit Rezeptoren ausgestattet, die den Zugang zu lymphatischen Organen ermöglichen. Da diese Eigenschaft von Memory T-Zellen Hauptgegenstand der Arbeit ist, wird später ausführlicher auf beteiligte Moleküle eingegangen werden.

Als weiteres Merkmal wird die Memory-Zellpopulation durch homöostatische Proliferation aufrechterhalten. Die Rate der Zellteilung muss bei CD8⁺ T-Zellen gleich der Rate des Zelltodes sein, da die Zahl konstant bleibt (1, 5, 6). Bei CD4⁺ Memory Zellen scheint hingegen die Zahl Ag-spezifischer Zellen mit der Zeit abzunehmen (6).

Die von Memory T-Zellen vermittelte protektive Langzeit-Immunität wird somit von der höheren Anzahl Ag-spezifischer T-Zellen, ihrer schnelleren Antwortfähigkeit, anatomischer Lokalisation (dort, wo Pathogene eindringen) und Langlebigkeit ausgemacht (5).

Modelle zur Entwicklung von Memory-T-Zellen

Bei der T-Zellantwort werden verschiedene Phasen durchlaufen, die für die Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses wichtig sind:

Als Erstes findet die „Expansions-Phase“ statt. Nach Ag-Kontakt der naiven T-Zelle im lymphatischen Organ findet eine klonale Expansion statt, wobei die T-Zelle zur Effektor T-Zelle differenziert. Hier unterscheidet man $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (Th) und $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs, cytotoxic T lymphocytes). Durch die Kombination der Fähigkeiten von $CD4^+$ und $CD8^+$ Effektor-T-Zellen, inflammatorische Zytokine zu sezernieren und infizierte Zellen zu töten, kann z.B. eine typische akute virale Infektion innerhalb von Tagen abgewehrt werden. Während der folgenden Wochen, nach Pathogenbefreiung stirbt die Mehrzahl (>90 %) der Effektorzellen. Diese zweite Phase wird „Todesphase“ oder „Kontraktionsperiode“ genannt. Die überlebenden T-Zellen erreichen das dritte Stadium, die „Memory-Phase“, in der sich die Anzahl der Memory-Zellen stabilisiert, da diese Zellpopulation lange Zeit aufrechterhalten bleibt (5).

Es gibt verschiedene zum Teil kontroverse Modelle zur Memoryzellentwicklung. Basierend auf zwei Grundmodellen wird eine Reihe von Memoryzellkonzepten entwickelt. Im Folgenden sollen nur die Grundmodelle vorgestellt werden:

- Es wird ein *divergenter Pfad der Memory-Zellentwicklung* angenommen, wobei sich aus einer naiven T-Zelle direkt entweder eine Effektor oder eine Memory T-Zelle entwickelt (5).
- Dagegen geht man bei dem *linearen Entwicklungsmodell* davon aus, dass sich aus einer naiven T-Zelle nach Ag-Kontakt eine Effektorzelle entwickelt, die in Abwesenheit von Ag zur Memory-Zelle wird (5).

Grundsätzlich ist es nicht möglich, phänotypisch auf Grund der Expression von Oberflächenmarkern zuverlässig zwischen Effektor und Memory-Zellen zu unterscheiden. Aus diesem Grunde wurden in der Arbeit T-Zellen *ex vivo*, die in der Lage waren, „Effektor-Zytokine“, wie IL-4, IL-10 oder $IFN-\gamma$ zu bilden, als Effektor/Memory T Zellen bezeichnet. Bei gesunden spezifisch pathogen frei-gehaltenen Mäusen (SPF, specific pathogen free), die frei von für die Tierart obligat pathogenen Keimen sind, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei hauptsächlich um Memory-Zellen gehandelt hat.

1.2. Das Th1/Th2-Modell und seine Bedeutung für Krankheit und Immunität

Naive CD4⁺ T-Zellen, d.h. T-Zellen, die zuvor niemals Kontakt mit „ihrem“ Ag hatten, erkennen über ihren T-Zellrezeptor (TCR, T cell receptor) auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) spezifisch „ihr“ Ag, das über den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse II (MHCII, major histocompatibility complex) präsentiert wird. Die Aktivierung des TCR wird auch „Signal 1“ genannt und wird weiter über Aktivierung von CD3, welches mit dem TCR assoziiert ist, vermittelt. Für eine adäquate Stimulation einer naiven T-Zelle, die zu Proliferation und Differenzierung führen soll, ist eine weitere Kostimulation („Signal 2“) nötig. Die Kostimulation erfolgt über die Aktivierung von CD28 auf der T-Zelle mittels Interaktion mit CD80/CD86 auf der APC. Als besonders gute Ag-Präsentatoren sind reife Dendritische Zellen (DC, dendritic cell(s)) geeignet, da diese eine sehr hohe Dichte an kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) besitzen.

In Präsenz von IL-12 bildet sich eine Effektorzelle, die bei erneutem Ag-Kontakt IFN- γ produziert (Th1-Zelle). Ist die naive T-Zelle bei Aktivierung hingegen IL-4 ausgesetzt, wird sie bzw. werden ihre Tochterzellen bei erneuter Aktivierung neben IL-4 Zytokine wie IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren (Th2-Zelle). Solche polarisierten T-Zellen entwickeln sich aus der gleichen Vorläuferzelle (7) und spielen wichtige Rollen bei der Infektionsabwehr und dem Krankheitsgeschehen.

Seit Mosmann 1986 erstmals Th1- und Th2- Zellen beschrieben hat (8), wurden noch weitere Th-Subpopulationen auf der Grundlage ihrer Zytokinproduktion postuliert. Hierzu gehören TGF β - produzierende Th3- (9) und IL-10-produzierende Tr1-Zellen (10). Diesen beiden Subpopulationen ist gemein, dass sie negativ regulierend in Immunprozesse einwirken sollen. Th-Zellen, die bei Aktivierung sowohl IFN- γ als auch IL-4 bilden, werden als Th0-Zellen bezeichnet; in wie weit es sich hierbei um eine eigene T-Zellsubpopulation oder eine Vorstufe von Th1 bzw. Th2 handelt, ist unklar. Das Th1/Th2-Schema stellt mit Sicherheit eine starke Vereinfachung der Komplexität *in vivo* dar. So werden *ex vivo* z.B. auch IL-10/IFN- γ doppelt-positive Zellen isoliert. Die Grundlage der unterschiedlichen Funktionen dieser Th-Zellsubpopulationen bilden die nach Aktivierung von Th1 und Th2-Zellen exprimierten Zytokinmuster.

Funktion und Wirkung von IFN- γ (11)

Neben CD40-Ligation durch T-Zellen direkt bewirkt auch IFN- γ eine Aktivierung von Makrophagen, welche dann besser phagozytierte intrazelluläre Erreger lysieren können; gleichzeitig werden MHC I und II hochreguliert, so dass eine effizientere Ag-Präsentation stattfinden kann. Daneben aktiviert dieses Zytokin NK-Zellen und auch auf somatischen Zellen werden MHC-Moleküle hochreguliert, womit virusinfizierte Zellen erkannt und ausgeremert werden können. Die zytotoxische Immunantwort und damit die Abwehr intrazellulärer Erreger wird also von IFN- γ (Th1-Zellen) gestützt.

Auf B-Zellen bewirkt IFN- γ einen Klassenwechsel zu Immunglobulin (Ig) G2a, IgG2b.

Funktion und Wirkung von IL-4 (11)

Eine der Hauptwirkungen von IL-4 ist die Aktivierung und Wachstumsinduktion von B-Zellen, wobei ein Klassenwechsel zu IgG1 und IgE induziert wird. Somit ist eine der Hauptaufgaben von Th2-Zellen, neben der Zytokinproduktion auch durch CD40-Ligation eine Aktivierung von B-Zellen, Induktion von MHCII-Molekülen und damit eine Unterstützung der humoralen Immunantwort gegen Pathogene. Gleichzeitig wird die Aktivierung von Makrophagen inhibiert und das Wachstum von Mastzellen angeregt. IgE spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten, in dem es diese über eine Brückenbildung zwischen Ag und Mastzelle zur Degranulation bewegt. Daneben ist IL-4 ein Überlebensfaktor für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (12).

Funktion und Wirkung von IL-10 (13)

Durch seine inhibitorische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen, Neutrophile und T-Zellen übernimmt IL-10 wichtige Funktionen in der Limitierung und Terminierung von Entzündungsprozessen.

IL-10 inhibiert die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen/Mediatoren wie IL-1, TNF und Chemokinen durch Makrophagen/Monozyten und Neutrophile. Gleichzeitig inhibiert es die Expression von MHCII- und kostimulatorischen (CD80, CD86) Molekülen auf der

Zelloberfläche, wodurch die T-Zell-aktivierende Kapazität durch Makrophagen/Monozyten stark eingeschränkt wird.

Im Gegensatz dazu induziert IL-10 auf B-Zellen eine verstärkte Expression von MHCII-Molekülen, darüber hinaus hat es eine positive Wirkung auf deren Überleben, Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen. Auch soll IL-10 als Switchfaktor für IgG1, IgG3 und in Kombination mit TGF β auch für IgA wirken.

Die meisten Effekte auf T-Zellen werden indirekt über die suppressiven Effekte auf APC vermittelt, doch kann IL-10 auch direkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen inhibieren. Auf CD8⁺ T-Zellen wurden allerdings auch positive Wirkungen auf Rekrutierung, Zytotoxizität und Proliferation beschrieben. Interessanterweise können unter IL-10-Einfluss aktivierte CD4⁺ T-Zellen zu nicht-reagierenden/anergenen Zellen oder in eine IL-10 produzierende regulatorische T-Zellsubpopulation „Tr1“ differenzieren.

1.2.1 Die pathogenetische Rolle von Th1- und Th2-Zellen

Neben den wichtigen Funktionen von Th1- und Th2-Zellen in der Infektionsabwehr führt eine Imbalance zwischen diesen Subpopulationen leider auch zu Erkrankungen. So sind Gewebszerstörungen durch überschießende Entzündung und die Entwicklung bzw. das Aufrechterhalten von Autoimmunität häufig eine Folge der zytotoxischen Wirkung von durch Th1-Zellen gebildeten IFN- γ s. Im Gegensatz dazu begünstigt eine überschießende Th2-Antwort, durch Th2-Zytokine übertragen, das Entstehen und Aufrechterhalten von Allergien. Hier spielen vorwiegend IgE-dominierte Prozesse eine große Rolle. Beispiele für Th1- und Th2-vermittelte Erkrankungen werden unter **1.3.9.** vorgestellt.

1.3. Die Rezirkulation von Lymphozyten: das Mehrschrittmodell der Transmigration

Das Aufspüren von Ag eingedrungener Pathogene und deren Bekämpfung erfordern eine ständige Überwachung des Organismus‘ durch patrouillierende Leukozyten. Hierfür rezirkulieren Lymphozyten permanent zwischen Blut und organisierten lymphatischen Geweben, die sie über lymphatische Gefäße wieder verlassen, um über den *Ductus thoracicus* in den Blutstrom zurückzukehren (14). In ähnlicher Weise werden Lymphozyten und andere Leukozyten vom Blut in Entzündungsgebiete rekrutiert. Der Prozess der Transmigration

benötigt mehrere sequentielle Schritte, die Adhäsions- und Aktivierungskomponenten enthalten (15-18), (Abb. 1).

Im ersten Schritt nimmt der Leukozyt Kontakt mit dem Endothel auf, wobei es durch transiente Interaktionen und Scheerkräfte zum sogenannten „Rolling“ kommt.

Als nächstes folgt ein schneller Aktivierungsschritt, der Integrine in einen funktionsfähigen Zustand überführt, welcher die Arrestierung und feste Adhäsion des Leukozyten an das Endothel zur Folge hat. Adhärente Leukozyten passieren das Endothel und lokalisieren in distinkte Gewebekompartimente durch sequentielle Verarbeitung chemotaktischer Signale unterschiedlicher Chemokinquellen (19).

Die ersten transienten Interaktionen und das "Rolling" werden meistens durch Mitglieder der Selektinfamilie und ihre speziellen Carbohydrat-tragenden Liganden vermittelt (20, 21).

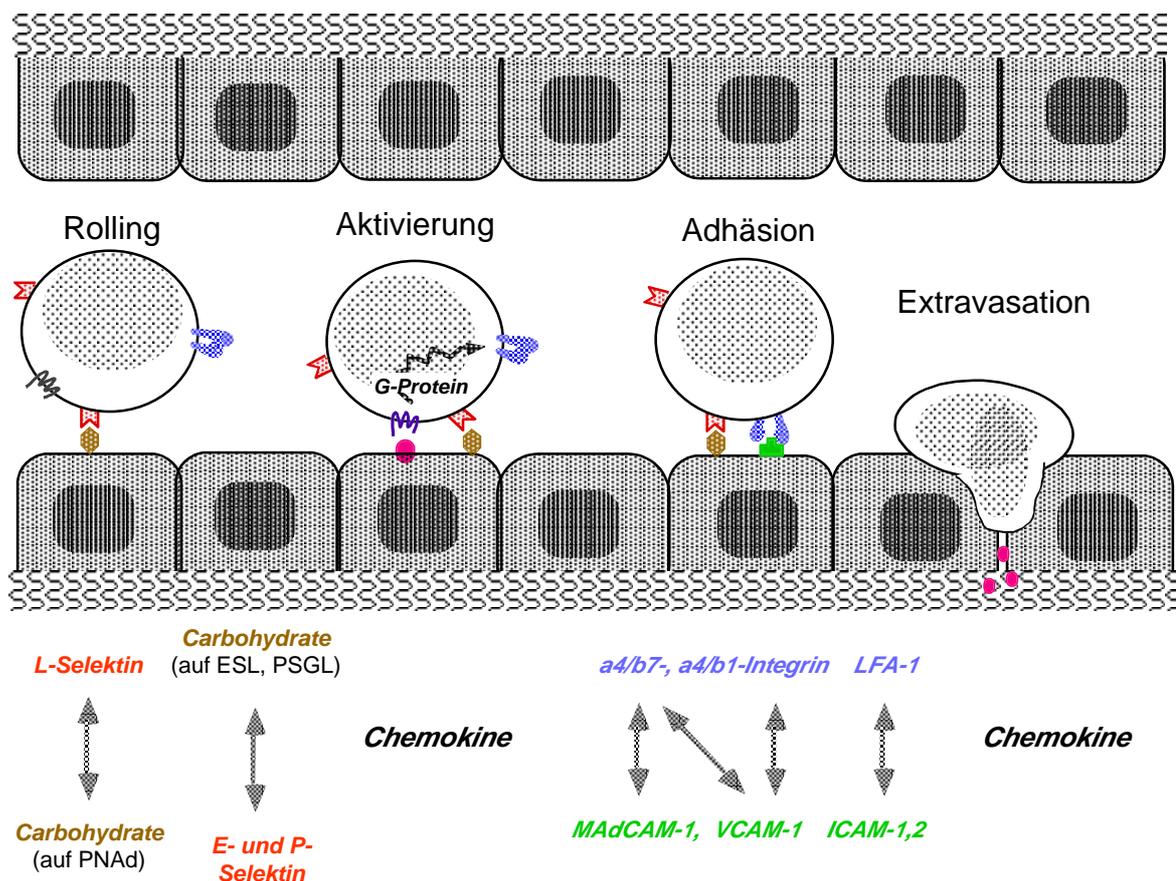


Abbildung 1: Das Mehrschrittmodell der Transmigration und beteiligte Moleküle

Die Adhäsion erfolgt über die Integrinfamilie, die mit Mitgliedern der Immunglobulinfamilie interagiert. Der Adhäsions-vermittelnde Aktivierungsschritt und die gerichtete Bewegung

innerhalb des Multistepmodelles werden durch Chemokine ausgelöst. Da Chemotaxis zu mehreren Vertretern dieser Molekülfamilie Hauptgegenstand dieser Arbeit ist, soll auf diese Gruppe ausführlicher eingegangen werden, auf die Adhäsionsmoleküle dagegen nur kurz.

In die Rezirkulation involvierte Moleküle:

1.3.1. die Adhäsionsmoleküle: Selektine, Integrine und ihre Liganden

Die Selektinfamilie und ihre Liganden

Selektine vermitteln meistens den ersten Schritt in der Transmigrationskaskade, das „Rolling“. Sie gehören zu den kalziumabhängigen Lektinen, die als Typ 1 Transmembranproteine an sialisierte Carbohydratgruppen binden (22).

Es gibt drei bekannte Selektine: P-, E- und L-Selektin, die große Strukturhomologien aufweisen.

P-Selektin (CD62P) wurde ursprünglich auf Thrombozyten nachgewiesen, später aber auch auf Endothel exprimiert gefunden (22). In beiden Zelltypen wird P-Selektin konstitutiv exprimiert und in sekretorischer Granula gelagert: in Weibel-Palade Körperchen des Endothels und α -Granula der Thrombozyten (22). Durch Stimulation mit proinflammatorischen Stimuli wie z.B. Histamin können die Granula innerhalb von Minuten mit der Zytoplasmamembran verschmelzen, und P-Selektin erscheint auf der Zelloberfläche. So kann P-Selektin die Regulation der sehr früheren Leukozytenrekrutierung übernehmen.

E-Selektin (CD62E) wird auch von Endothelzellen exprimiert, wird aber im Gegensatz zu P-Selektin nicht in der Zelle gelagert; stattdessen wird es transkriptional reguliert. So induzieren inflammatorische Stimuli, wie IL-1 oder Lipopolysaccharide (LPS) seine Transkription. Dadurch wird nach wenigen (ca. vier) Stunden eine maximale Oberflächenexpression des Moleküls gefunden. Im Gegensatz zu P-Selektin verschwindet E-Selektin nur sehr langsam durch Internalisierung von der Zelloberfläche (22).

L-Selektin (CD62L) wird von den meisten Leukozyten exprimiert und dient als Homingrezeptor für lymphatische Gewebe (Lymphknoten, Peyer'sche Plaques) (23). Obwohl

es auf Leukozyten konstitutiv exprimiert ist, wird es nach Aktivierung schnell durch Proteolyse abgeworfen, ein Prozess, der auf ruhenden Leukozyten konstitutiv und sehr langsam abläuft (24, 25).

Liganden für P-Selektin sind CD24 und PSGL-1, die zur Bindungsfähigkeit mit fukosylierten und sialisierten Oligosacchariden modifiziert sein müssen. Neutrophile exprimieren konstitutiv bindungsfähige Liganden, naive Lymphozyten hingegen nur nicht-bindungsfähiges PSGL-1, welches nach Aktivierung modifiziert werden kann (22).

Liganden für E-Selektin stellen ESL-1, PSGL-1 und L-Selektin dar (26, 27), wobei bindungsfähiges ESL-1 auch CLA (Cutaneous Lymphocyte Ag, Hautlymphozyten-Ag, E-Selektin-Ligand) genannt wird. CLA⁺ Lymphozyten werden auch als hautspezifisch angesehen, da sie präferentiell dorthin rekrutiert werden (28, 29).

Als Liganden für L-Selektin sind u.a. vier Moleküle, auf denen der Bindungspartner PNAd (peripheral lymphnode Addressin) erkannt wird, bekannt: GlyCAM-1, MAdCAM-1, CD34 und Sgp200. Die Liganden werden auf speziellem hochprismatischem Endothel von Venolen (HEV, high endothelial venules), das in Lymphknoten und Peyer'schen Plaques zu finden ist, exprimiert.

Die Integrinfamilie und ihre Liganden

Mitglieder der Integrinfamilie vermitteln die feste Adhäsion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix oder zwischen Zellen untereinander. Diese heterodimeren transmembranären Glykoproteine bestehen aus zwei Ketten, der α - und der β - Kette, die nicht kovalent verbunden sind. Es sind beim Menschen 8 β -Ketten und 18 α -Ketten bekannt, die miteinander kombiniert werden können, wovon 24 verschiedene Heterodimere bisher gefunden wurden (30).

Für das Homing von Leukozyten sind insbesondere die in Tabelle 1 aufgeführten Integrine von Bedeutung.

<i>Integrin</i>	<i>andere Namen</i>	<i>Liganden</i>	<i>Rolle in</i>
$\alpha 4\beta 1$	CD49d/CD29, VLA-4, LPAM-2	VCAM-1, Fibronectin	Lymphozyt/Extrazelluläre Matrix-Interaktionen, Eintritt in entzündliche Gewebe
$\alpha 4\beta 7$	LPAM-1	MAdCAM-1, VCAM-1, Fibronectin	Eintritt in die Mukosa
$\alpha 5\beta 1$	CD49e/CD29, VLA-5	Fibronectin, L1-Zell-adhäsionsmolekül	Lymphozyt/Extrazelluläre Matrix-Interaktionen
$\alpha 6\beta 1$	CD49f/CD29, VLA-6	Laminin	Lymphozyt/Extrazelluläre Matrix-Interaktionen, Eintritt in den Thymus
$\alpha L\beta 2$	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	Extravasation
$\alpha M\beta 2$	Mac-1, CD11b/CD18, CR3	ICAM-1, Fibrinogen, C3bi, Glykan, Hyaluronat, Fibronectin, Kollagen	Eintritt in entzündliche Gewebe (Monozyten)

Tabelle 1: Integrine, die für die Rezirkulation von Leukozyten bedeutsam sind

Für eine feste Bindung zwischen Integrinen und ihren Liganden, müssen sie durch Konformations- oder Aviditätsänderung, die durch Zellaktivierung ausgelöst wird, in einen bindungsfähigen Zustand überführt werden. In vielen Fällen zeigte sich, dass Chemokine diesen adhäsionsvermittelnden aktivierenden Schritt übernehmen können (15).

1.3.2. Die Familie der Chemokine (und Chemokinrezeptoren)

Chemokine sind kleine **chemotaktische Zytokine**, die ihren Namen der Fähigkeit verdanken, Zellen gerichtet entlang eines Konzentrationgradienten anzulocken.

Chemotaktisch wirken auch eine Reihe anderer Moleküle; hier reicht das Spektrum von Lipiden bis zu Nukleotiden. Allerdings sind Chemokine einzigartig in ihrer molekularen Stabilität, und Zielzellspezifität (31).

Über die anfängliche Sicht hinaus Chemokine würden einfach Leukozyten in Entzündungsregionen locken, ist inzwischen bekannt, dass sie zusätzlich bei vielen anderen Prozessen von Bedeutung sind, wie in der Organentwicklung, Angiogenese, Angiostase, homöostatischen Leukozytenrezirkulation und Immunregulation (31).

1.3.3. Einteilung von Chemokinen

Chemokine bilden eine homologe Superfamilie relativ kleiner Proteine zwischen 8-17 kDa, die wahrscheinlich durch Duplikation und Modifikation von Vorläufergenen entstanden sind. Die Chemokinsuperfamilie wird in vier Untergruppen geteilt: als Basis dient das Arrangement N-terminaler Cysteinreste. Sie werden C, CC, CXC, CXXXC genannt, wobei C für Cysteinreste und X für zwischenständige andere Aminosäuren steht. Die CXC-Subfamilie wird manchmal auch weiter in ELR (ELR⁺) und nicht-ELR (ELR⁻) Typen klassifiziert. Hier dient als Basis das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein eines Triplett-Aminosäuremotivs (ELR=Glu-Leu-Arg), das dem ersten Cystein-Aminosäurerest in der Primärstruktur des Chemokins vorausgeht. Das Vorhandensein dieses Motivs gibt dem Chemokin angiogenetische Wirkung, während ELR⁻ Chemokine angiostatische Wirkung haben (32).

Des Weiteren werden Chemokine auch nach ihrem Expressionsmuster in inflammatorische/induzierbare und homöostatische/konstitutiv exprimierte Chemokine eingeteilt. So zählen CCL19, CCL21, CXCL12 und CXCL13 zu den homöostatischen Chemokinen und alle anderen Vertreter zu den inflammatorischen. Diese Einteilung ist manchmal verwirrend, da zunehmend auch homöostatische Chemokine an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind und ihre Expression auch reguliert wird (und damit "induzierbar" wird). Ähnliches gilt für „inflammatorische“ Chemokine; so wird z.B. CCL17 konstitutiv im Thymus exprimiert und erfüllt dort homöostatische Funktionen (33). Dasselbe gilt für CCL25, welches konstitutiv von Epithelzellen des Dünndarmes exprimiert wird und wahrscheinlich an homöostatischer Rezirkulation von Lymphozytensubpopulationen beteiligt ist (34-36).

In der Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung gibt es ein hohes Maß an Redundanz und Bindungs-Promiskuität: So kann ein einzelnes Chemokin an mehrere Rezeptoren hoch affin binden und mehrere Chemokine an einen Rezeptor. Dabei muss man beachten, dass dies eher eine Eigenschaft der sogenannten „Cluster“-Chemokine (siehe unten) ist, und gerade bei den „Nicht-Cluster“-Chemokinen gibt es Vertreter, die in ihrer Funktion nicht zu ersetzen sind. Selbst bei sehr redundanten Chemokinen muss man beachten, dass diese zum Teil sehr zellspezifisch sezerniert werden und eine Zelle z.B. „ihr“ Neutrophilen- bzw. Monozyten-anlockendes Chemokin bildet (37).

1.3.4. Chemokinrezeptoren

Chemokine vermitteln ihre Effekte durch Bindung und Signalgebung über Guanosin-Nukleotid-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, GPCR). GPCR stellen eine Familie von Rezeptoren dar, die mehr als 1000 Mitglieder beherbergt, welche ein weites Spektrum von extrazellulären Stimuli kennen: Hormone, Neurotransmitter, Chemokine, Geruchsstoffe, Licht (31).

In der Regel bestehen Chemokinrezeptoren aus 320-380 Aminosäuren und weisen starke Sequenzhomologien auf. Wie alle bekannten GPCR bestehen Chemokinrezeptoren aus sieben transmembran-spannenden, hydrophoben Domänen mit drei intrazellulären und drei extrazellulären hydrophoben Schleifen. Eine potentiell glykosylierte, extrazelluläre aminoterminal Region ist in die Chemokinbindung involviert, während die carboxyterminale Region mit dem G-Protein verbunden ist, wo auch regulatorische Phosphorylierungen stattfinden.

Bei Chemokinrezeptoraktivierung durch extrazelluläre Ligandenbindung wird eine Interaktion mit dem GDP-beherbergendem trimären G-Protein provoziert (31, 38, 39). Hieraus resultiert ein Austausch von GDP zu GTP, der das G-Protein zur Dissoziation in G-alpha- und G-beta/gamma-Untereinheiten zwingt. Die abdissoziierte GTP- α -Untereinheit aktiviert Enzyme wie die Phospholipase C und die Phosphoinositol-3-kinase, welche ein Membran-Phospholipid in Inosit-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spalten. IP₃ setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum Calciumionen frei, und DAG bleibt in der Membran und aktiviert Isoformen der Proteinkinase C (PKC) (31, 40). PKC und Ca²⁺ tragen die Reaktionskette weiter, und es folgt eine Kaskade von Phosphorylierungen, die eine Reihe von Kinasen und kleinen GTPasen (z.B. Ras und Rho) aktivieren, welche direkt auf Zellfunktionen wie Adhäsion, Chemotaxis und Degranulation wirken (31).

Nach Ligation können Chemokinrezeptoren internalisiert, degradiert oder recycelt werden, was dazu führt, dass die Zelle temporär nicht mehr auf weitere Liganden-Stimulationen reagieren kann. Zusätzlich enthält die C-terminale Region Zielbereiche, die nach Phosphorylierung durch GPCR-Kinasen regulatorische Elemente (Arrestine) zu binden erlauben. Dies kann dann zu einer Entkoppelung vom G-Protein bzw. zu einer Desensibilisierung führen (41, 42).

Als weiteres Regulationsmolekül sind GTPasen bekannt, die das G-Protein funktionell außer Kraft setzen (RGS, regulators of G-protein signaling) (43).

Zunächst wurde lediglich das Vorkommen von Chemokinrezeptoren auf Leukozyten beschrieben, inzwischen kennt man sie auf endodermalen, mesenchymalen, ektodermalen und neuroektodermalen Zellen. Somit erscheint es möglich, dass Chemokine bei Wachstum und Migration von epithelialen Zellen der Haut, des Verdauungs- und Fortpflanzungsapparates und von Neuronen sowie Gliazellen des Zentralen Nervensystems beteiligt sind (31) .

1.3.5. Chemokin-Evolution

Aus phylogenetischer Sicht ist die gerichtete Zellbewegung auf externe Stimuli eine alte biologische Fähigkeit. So wurden G-Protein-vermittelte migratorische Antworten in Protozoen demonstriert (44). Vergleichende Analysen der Aminosäuresequenzen zwischen Säugern und primitiven Vertebraten weisen darauf hin, dass CXC- und CC- Chemokine divergierend aus einem ankestralen Gen hervorgingen, wahrscheinlich bevor sich die verschiedenen Ordnungen der Säuger entwickelten, möglicherweise sogar vor Entwicklung der Vertebraten (45, 46). Somit stellt das Chemokinsystem ein sehr altes System der zellulären Kommunikation dar, das eine intensive Verfeinerung in der weiteren Evolution erfahren hat.

Viele Chemokine sind in Hauptgenclustern angeordnet. So kennt man beim Menschen ein Gencluster, in dem CXC-Chemokine, die auf neutrophile Granulozyten wirken, und ein anderes, in dem Gene für CC-Chemokine, die vorwiegend auf Monozyten wirken, lokalisiert sind. Gene für vorwiegend auf Lymphozyten- wirkende CC- oder CXC-Chemokine liegen von den Hauptclustern entfernt (37).

Die Chemokine, die von den Hauptclustern entfernt liegen, sind wahrscheinlich aus evolutionärer Sicht älter und aufgrund ihrer sehr spezifischen Funktionen höher konserviert zwischen den Spezies. Gleichzeitig ist es auch weniger wahrscheinlich, dass sie Rezeptoren teilen oder mit anderen Chemokinen überlappende Funktionen haben (37).

Wenn man die Chemokinfamilie in eine Gruppe „Nicht-Cluster“- und zwei Gruppen „Cluster“-Chemokine teilt, resultiert daraus wenig Redundanz sowie eine gute Korrelation zwischen Funktionen humaner Chemokine und der anderer Säuger (37).

CXC-Rezeptorfamilie (α -Chemokine)			
Systematischer Name	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Rezeptor(en)
CXCL1	GRO α /MSA- α	GRO/KC?	CXCR1, CXCR2
CXCL2	GRO β /MSA- β	GRO/KC?	CXCR2
CXCL3	GRO γ /MSA- γ	GRO/KC?	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	unbekannt
CXCL5	ENA-78	LIX?	unbekannt
CXCL6	GCP-2	CK α -3	CXCR2
CXCL7	NAP-2	unbekannt	CXCR2
CXCL8	IL-8	unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	I-TAC	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α , SDF-1 β ,	SDF-1	CXCR4
CXCL13	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	BRAK/bolekine	BRAK	unbekannt
CXCL15	unbekannt	Lungkine	unbekannt
CXCL16	SEXCKine	"CXCL16"	CXCR6 (BONZO)

CC-Rezeptorfamilie (β -Chemokine)			
Systematischer Name	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Rezeptor(en)
CCL1	I-309	TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	MIP-1 α /LD78 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	unbekannt	C10	unbekannt
CCL7	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	MCP-2?	CCR3
CCL9	unbekannt	MRP-2/CCF18/MIP-1 γ	unbekannt
CCL10 (reserviert)			
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12	unbekannt	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	unbekannt	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	unbekannt	CCR1
CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	unbekannt	CCR1, CCR3

CCL16	HCC-4/LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	TARC	TARC/ABCD-2	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC/AMAC-1	unbekannt	unbekannt
CCL19	MIP-3 β /ELC/exodus-3	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 α /LARC/exodus-1	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC/exodus-2	6Ckine/SLC/exodus-2/ TCA-4	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	unbekannt	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	unbekannt	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	unbekannt	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	ALP/CTack/ILC/ ESkine	CCR10
CCL28	MEC	MEC	CCR10
CX ₃ C-Rezeptorfamilie			
Systematischer Name	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Rezeptor
CX ₃ CL1	Fractalkine	Neurotactin/ABCD-3	CX3CR1

C-Rezeptorfamilie			
Systematischer Name	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Rezeptor
XCL1	ATAC/Lymphotactin/SCM-1 α	Lymphotactin/ATAC	XCR1
XCL2	SCM-1 β	unbekannt	XCR1

Tabelle 2:

Systematischer Name und gängige Namen der humanen und murinen Liganden nach Vorschlag von Zlotnik und Yoshie (37), anerkannt vom Nomenklatur-Komitee der International Union of Pharmacology (NC-IUPHAR), veröffentlicht von Murphy et al. (47) und erweitert nach Vorschlägen von Matloubian et al. (48) und Wang et al. (49). Als korrespondierende(r) Rezeptor(en) wurden Hauptrezeptoren aufgeführt, obwohl einige Liganden auch noch weitere Nebenrezeptoren binden können. Bei mit „?“ gekennzeichneten Liganden ist es unklar, ob das Mausehomolog dem humanen gelisteten Liganden entspricht. Wegen der Überfülle an verschiedenen Bezeichnungen für ein Molekül erfüllen die „gängigen“ Namen keinen Anspruch auf Vollständigkeit. In der Arbeit verwendete Liganden erscheinen **fett** gedruckt.

1.3.6. Chemokine in Entwicklung und Homöostase

Nachdem zunächst die Rolle von Chemokinen in der Pathogenese von Entzündungen untersucht worden war, stellte man inzwischen fest, dass Chemokine auch konstitutiv unter physiologischen Umständen exprimiert werden und hier wichtige Funktionen erfüllen.

1.3.6.1 Thymus

Der Thymus beherbergt in unterschiedlichen Kompartimenten eine Reihe von Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen (50). Während der Thymozytenreifung übernehmen Chemokine eine wichtige Rolle in der entwicklungsabhängigen Lokalisation im Thymus. So wird auf Thymozyten ein vom Reifegrad und Lokalisation abhängiges, unterschiedliches funktionelles Chemokinrezeptorrepertoire gefunden (51, 52). Die bekanntesten Bewegungen innerhalb des Thymus sind erstens die Migration positiv selektionierter Zellen vom Cortex in die Medulla und zweitens das Auswandern negativ selektionierter Zellen aus dem Thymus in die Zirkulation. Mit diesen Zellbewegungen korrelieren Änderungen in der Chemotaxis zu CCL25, CCR4- und CCR7-Liganden (51, 52).

1.3.6.2 Hämatopoese/ Knochenmark und andere nicht-lymphatische Organsysteme

Eine Sonderrolle unter den Chemokinen nimmt CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 ein, deren Defizienz bereits pränatal letal ist (53-56).

So spielt CXCL12 eine unersetzbare Rolle in der B-Lymphopoese und Myelopoese. CXCR4-/CXCL12- defiziente Mäuse haben dysorganisiertes Knochenmarksstroma sowie weitere Defekte in der Herzseptumformation, Blutgefäßentwicklung des Magen-Darm-Traktes, und der Kleinhirnentwicklung (53-56).

1.3.6.3 Sekundäre lymphatische Organe

Die meisten adaptiven Immunantworten werden in sekundären lymphatischen Organen initiiert, wobei die T-Zone als Treffpunkt von Ag-spezifischen T-Zellen und Ag-präsentierenden DC fungiert. Somit gibt die Lymphozyten-Rezirkulation T-Zellen die Chance, auf eine DC zu treffen, die das passende Ag präsentiert (57).

Inzwischen kennt man einige molekulare Grundlagen der Lymphozytenrezirkulation durch lymphatische Organe:

Eintritt von T-Zellen und DC in sekundäre lymphatische Organe

Prinzipiell gibt es zwei Wege, wie T-Zellen in Lymphknoten gelangen können:

1. Über das Blut passieren vorwiegend naive T-Zellen spezielle Venolen mit hochprismatischem Endothel (HEV, high endothelial venules). Hierbei findet ein durch L-Selektin (CD62L) -vermitteltes „Rolling“, gefolgt von Aktivierung und anschließender Integrin-vermittelter Adhäsion und Transmigration statt. Der Aktivierungsschritt wird über CCR7 und seine Liganden CCL19 und CCL21 vermittelt (58, 59). CCR7 wird von naiven T-Zellen und einem Teil der Memory-T-Zellen exprimiert (60, 61). Die HEV exprimieren große Mengen an CCL21 (62). Zusätzlich wird auf den HEV durch Transzytose CCL19 präsentiert (63).

2. Über die afferente Lymphe gelangen vorwiegend Memory T-Zellen zusammen mit DC in die Lymphknoten. Das murine Lymphgefäßendothel außerhalb lymphatischer Organe exprimiert die sogenannte periphere Form von CCL21 (CCL21-Leu, durch Austausch eines Ser gegen Leu) im Gegensatz zu der in lymphatischen Organen exprimierten lymphatischen Form von CCL21 (CCL21-Ser) (64, 65). Bei der Reifung, nach Ag- Kontakt, regulieren DC Rezeptoren für inflammatorische Chemokine wie CCR1 und CCR5 herunter und exprimieren stattdessen große Mengen von CCR7 (66). Über die CCR7-CCL21 Interaktion soll es dann möglich sein, dass DC die Peripherie verlassen und über den Lymphweg in Lymphknoten gelangen (66-69).

Für die Rezirkulation von Lymphozyten in Peyer'sche Plaques bleibt nur Weg1, da diese keinen Lymphzufluss besitzen; allerdings kann hier für die Rezirkulation auch $\alpha4\beta7$ zum Rolling auf MadCAM-1 benutzt werden (70).

Der Eintritt in die Milz ist unabhängig von Weg1 und 2. Hier gelangen Lymphozyten direkt über die Zentralarterie in das Organ. Der Zugang zur weißen Pulpa (T- oder B-Zone) ist allerdings -wie auch in Peyer'schen Plaques und Lymphknoten- abhängig von der Expression spezifischer Chemokinrezeptoren (s.u.).

Die T-Zone und T-Zell-DC-Kontakte

CCR7-Liganden werden in der T-Zone von dort ansässigen Stromazellen gebildet, wo zusätzlich auch Subpopulationen von DC CCL19 produzieren (71, 72). Diese Expression sorgt für eine Kolokalisation CCR7- exprimierender T-Zellen und DC (62, 69, 71, 73). Wie wichtig die CCR7-CCL19/CCL21-Interaktion bei der Strukturierung sekundärer lymphatischer Organe ist, wurde ersichtlich durch Charakterisierung der CCR7-defizienten („knock-out“, CCR7^{-/-}) Maus (68) und einer natürlich vorkommenden Mausmutante, *plt* (paucity of lymphnode T cells), die defizient in der Expression von CCL19 und der lymphatischen Form von CCL21 ist. Bei diesen Tieren ist die Anzahl an T-Zellen in den Lymphknoten dramatisch reduziert. T-Zonen werden nicht gebildet und die T-Zellen befinden sich delokalisiert in roter Pulpa (Milz) oder Marginalsinus (Lymphknoten) (68, 69).

Eintritt von B-Zellen in sekundäre lymphatische Organe

In *plt*- und CCR7^{-/-}-Maus waren B-Zellen nur zu 50 % in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt in lymphatische Organe zu rezirkulieren, was darauf hindeutete, dass diese, anders als T-Zellen, CCR7-unabhängige Mechanismen benutzen können, um aus dem Blut in lymphatische Gewebe zu gelangen (68, 69).

Kürzlich konnte von Okada et al. gezeigt werden, dass für den B-Zelleintritt in sekundäre lymphatische Organe CXCR5-CXCL13 limitierte und CXCR4-CXCL12 sowie CCR7-CCL19/21 Interaktionen redundante Rollen einnehmen (74).

CCR7 und Effektor/Memory T-Zellen

Sallusto et al. berichteten, dass CCR7 nur von einer Subpopulation humaner Memory (CD45RA⁻) T-Zellen exprimiert würde, welches nach polyklonaler Stimulation nicht in der Lage war, Zytokine wie IL-4 oder IFN- γ zu bilden (61).

Auf dieser Beobachtung basierend sollte CCR7 als Marker für eine zentrale Memorysubpopulation („Central Memory“) dienen, welches in lymphatische Organe rezirkuliert. In dieser Studie war die CCR7⁻ Memoryzellsubpopulation heterogen in der CD62L-Expression, exprimierte Rezeptoren für inflammatorische Chemokine, wie CXCR3 und enthielt alle T-Zellen, die IL-4 oder IFN- γ bilden konnten (61). Entsprechend enthielt die CCR7⁻CD8⁺ T-Zellsubpopulation sämtliche Zellen mit zytotoxischen Fähigkeiten (61). Wegen dieser Eigenschaften wurden CCR7⁻ Memory T-Zellen als periphere Effektor-Memory-T-Zellsubpopulation („Effector Memory“) bezeichnet (61).

Zu einem völlig anderen Ergebnis kamen Kim et al., die einen etwas anderen Färbeansatz zur Korrelation von Zytokinproduktion und CCR7-Expression humaner T-Zellen wählten. Hier war die Mehrheit der zytokinpositiven Zellen in der CCR7⁺ Fraktion (75). Sogar IFN- γ ⁺ T-Zellen, die aus entzündlich veränderten Gelenken isoliert wurden, waren vielfach positiv für diesen Rezeptor (75). Schon zuvor konnte Campbell et al. zeigen, dass aus peripheren, entzündeten und nicht-entzündeten Geweben (Gelenk, Haut, Darm) isolierte T-Zellen, CCR7 exprimierten (60).

In der Maus wurden, neben naiven T-Zellen, *in vitro* differenzierte Th1-Zellen als positiv für CCR7 beschrieben. Hier war die Expression von CCR7 Ursache für eine Lokalisation von Th1-Zellen in der T-Zone (76). Später beobachtete eine andere Arbeitsgruppe eine hohe Antwortfähigkeit von murinen Effektorzellen *ex vivo* zu dem CCR7 Liganden CCL21 (77). Diese Effektorzellsubpopulation zeichnete sich dadurch, aus IL-4 und IFN- γ zu produzieren, eine effiziente P-Selektinligandenexpression zu besitzen und nach Transfer in andere Mäuse eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (delayed-type hyperreactivity, DTH) zu übertragen (77). Somit gab es einige Evidenzen für die Expression von CCR7 auf Effektorzellen der Maus.

Auf Grund dieser sehr widersprüchlichen Daten war es unklar, ob die Fähigkeit von Effektor/Memory T-Zellen, in periphere und/oder entzündete Gewebe einzuwandern, das Vermögen über CCR7 in sekundäre lymphatische Organe zu rezirkulieren, ausschließt.

Der B-Zell-Follikel, T-Zell-B-Zell-Kontakte und Follikuläre B-Helfer-T-Zellen

Eine weitere Kompartimentbildung sekundärer lymphatischer Organe wird durch CXCR5 und seinen Liganden CXCL13 vermittelt. Untersuchungen zeigten, dass CXCL13 im Follikel (78-80) von residenten Stromazellen (78) und HEV (74, 80) gebildet wird.

Fast alle B-Zellen und eine kleine Subpopulation von Memory T-Zellen exprimiert CXCR5 und migriert zu CXCL13 (79-83).

CXCR5- und CXCL13-defiziente Mäuse weisen einen sehr ähnlichen Phänotyp auf: Formationen von Peyerschen Plaques sind entweder in der Zahl reduziert, nur rudimentär vorhanden oder fehlen ganz (78, 84). Einige Lymphknoten fehlen vollständig und Primär-/Sekundärfollikel in der Milz weisen Strukturabnormalitäten auf (78, 84). Im Lymphknoten sind nur noch follikuläre (F)DC- (und CXCL13-) defiziente Follikel vorhanden, die weder in Peyer'schen Plaques noch Milz zu finden sind (78). Diese speziellen FDC⁻-Follikel erlauben den Eintritt von B-Zellen unabhängig von CXCR5 oder CXCL13 (78), ansonsten können in Wildtyp-Tiere transferierte CXCR5^{-/-}-B-Zellen nicht in die Follikel gelangen (78, 84).

Nach Aktivierung exprimieren einige CD4⁺ T-Zellen CXCR5⁺ und werden für B-Helfer-T-Zellen gehalten, da diese in den Follikel einwandern (83) und dort wahrscheinlich B-Zell-Hilfe leisten. Die Fähigkeit der B-Zell-Hilfe wurde *in vitro* nachgewiesen (79, 80, 82). Es wird angenommen, dass diese T-Zellsubpopulation CCR7 herunter-, CXCR5 dafür hochreguliert, damit sie die T-Zone verlassen und in den Follikel eintreten können (79, 82, 83). Die CXCR5-Expression von T-Zellen im Blut ist anscheinend nur transient, da Tetanustoxoid-spezifische Memory T-Zellen aus diesem Kompartiment negativ für CXCR5 sind und den Rezeptor erst nach Neu-Vakzinierung exprimieren (85) bzw. CXCR5⁺ T-Zellen nach Aktivierung den Rezeptor verlieren (81, 82).

Ebenso können *in vitro*-aktivierte T-Zellen transient zur CXCR5-Expression gebracht werden, allerdings nicht unter Th1, Th2 oder Th0-polarisierenden Bedingungen (85). Darüber hinaus soll diese T-Helfer-Zellsubpopulation die B-Zell-Hilfe auch unabhängig von Th2-Zytokinen

leisten, da Zytokinexpressionsanalysen zeigten, dass diese Zellen wenig IL-4, IL-5, oder IFN- γ , bzw. nur IL-2 oder IL-10 exprimieren (79, 80, 82). Stattdessen sind CXCR5⁺ T-Zellen, neben CD40L (79, 80, 82) und OX40 (82) positiv für ICOS (79, 80), ein Molekül, dem Fähigkeiten in der B-Zell-Hilfe zur Ak-Produktion zugesprochen werden (86-88).

Aufgrund ihrer Eigenschaften werden diese Zellen Follikuläre B-Helfer-T-Zellen (T_{FH}) genannt (79, 80), wobei Kim et al. darüber hinaus eine Unterteilung in CD57⁺ GC-Th (Germinal Center T helper cells, Keimzentrums-T-Helferzellen) vornehmen, da sie die unmittelbare Fähigkeit zur B-Zell-Hilfe *in vitro* besitzen, während die CD57⁺ erst voraktiviert werden müssen (82).

Bei B-Zell-Rezeptor (BCR) -Aktivierung regulieren B-Zellen CCR7 hoch, während die CXCR5-Expression unverändert bleibt. Gleichzeitig nimmt die Ansprechbarkeit auf CCL19 und CCL21 zu, und *in vivo* begibt sich die B-Zelle aus dem Follikel heraus an die T-B-Grenze (89). Hier kann sie, wahrscheinlich noch verstärkt durch eigene Chemokinexpression von Memory-T-Zell- anlockenden Chemokinen wie CCL3 und CCL22 mit T-Zellen interagieren (73). An dieser Stelle differenziert eine B-Zelle entweder in eine kurzlebige Plasmazelle oder migriert in den Follikel, um Keimzentren zu bilden (90).

1.3.7. Chemokine und Infektion

Die Verbindung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem über Chemokine im Infektionsgeschehen

In der Erregerabwehr ist eine Alarmierung des Immunsystems wichtig. Dabei steht an erster Stelle das Erkennen eines Eindringlings, wobei Strukturerkennungsrezeptoren (PRRs, Pattern-recognition receptors) hier eine wichtige Funktion einnehmen.

Diese Rezeptoren erkennen konservierte Molekülstrukturen, die von einer Vielzahl von Mikroorganismen geteilt werden. Zu den PRRs gehören Toll-like Rezeptoren (TLRs), die z.B. von DC und Gewebsmakrophagen exprimiert werden. Die Aktivierung der TLRs zieht eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach sich und führt auch zur Modulation der Chemokinrezeptorexpression auf DC (66, 91). Zusätzlich werden nach TLR-Aktivierung Chemokine freigesetzt, die zum Anlocken spezifischer Leukozyten führen. Inzwischen weiß

man, dass die Aktivierung verschiedener TLRs auf DC die Freisetzung verschiedener Chemokine zur Folge hat, die dann wiederum die Qualität der angelockten Leukozyten beeinflussen.

Damit bestimmt bereits der Erreger durch seine Struktur (die bestimmte TLRs aktivieren werden) die Qualität des Gewebeeinfiltrates. Beispielsweise wird CXCL10 durch Aktivierung von TLR4-Agonisten wie *Escherichia coli*-LPS, wohingegen CXCL8 von *Staphylococcus aureus*-Peptidoglycan über TLR2-Aktivierung von DC ausgeschüttet wird (91). CXCL10 wird aktivierte T-Zellen, CXCL8 hingegen neutrophile Granulozyten anlocken.

Eine weitere Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem wird über NK-Zellen geschaffen. Diese werden früh von gewebsansässigen Zelltypen bei viralen Infektionen über CCR5-Liganden wie CCL3 und CCL4 angelockt, wo sie bei Aktivierung (=Erkennen von infizierten Zellen) IFN- γ produzieren, welches in vielen Zellen, die Produktion von CXCR3-Liganden induziert, die dann wiederum aktivierte T-Zellen an den Ort des Geschehens rekrutieren, wo sie die adaptive Immunantwort übernehmen (91).

1.3.8. Organ- bzw. subpopulationsspezifisches Homing von T-Zellen

Organspezifisches Homing

Nachdem bereits James Gowans festgestellt hatte, dass Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe rezirkulieren und sie über efferente Lymphe wieder verlassen (14), beobachtete man später, dass Memory-Lymphozyten selektiv wieder in das Organ rezirkulierten, aus dem sie stammten (92, 93).

Vor diesem Hintergrund entstand das Konzept der gewebsspezifischen Migration von Lymphozyten.

CCR7 und die präferentielle Migration in sekundäre lymphatische Organe

CCR7 zusammen mit CD62L erlauben T-Zellen den Eintritt in sekundäre lymphatische Organe (s.o).

Haut-Homing

Als erster hautspezifischer Homingrezeptor wurde CLA beschrieben, dessen Bindungspartner E-Selektin bevorzugt von Hautendothel exprimiert wird (29, 94). Es wird angenommen, dass T-Zellen, die CLA tragen, wieder präferentiell in die Haut migrieren. Der Chemokinrezeptor CCR4, der von der Mehrzahl CLA⁺ T-Zellen (95), aber nur von einer Minderheit Darm-zirkulierender Lymphozyten (s.u.) exprimiert wird, übernimmt eine wichtige Funktion in der Einwanderung in die gesunde sowie entzündete Haut (95, 96), wo seine Liganden CCL17 und CCL22 gebildet werden (95). So wird CCL17 vom Blutgefäßendothel der Haut, aber nicht von dem des Darms gebildet. Die CCL17 Expression wird in Entzündung verstärkt (95). Neuerdings wurde CCL27, ein Ligand für CCR10, ebenfalls präferentiell in der Haut, von Keratinozyten exprimiert, gefunden, wobei viele CLA⁺ T-Zellen positiv für CCR10 sind (97). Zumindest in Entzündung scheinen diese Rezeptor-/Chemokinverbindungen überlappende Funktionen zu haben, denn in einer DTH-ähnlichen Hautentzündung mussten sowohl CCR4, als auch CCR10 gleichzeitig inhibiert werden, um Lymphozyteneinwanderung aus dem Blut zu blockieren (96).

Darm-Homing

Neben dem Adressin MAdCAM-1, das spezifisch von entzündeten und nicht-entzündeten Mukosaendothel exprimiert wird (98) und bei Interaktion mit $\alpha 4\beta 7$ -positiven Darm-zirkulierenden T-Zellen für deren Einwanderung sorgt, spielt CCR9 wahrscheinlich bei der Einwanderung in den Dünndarm eine Rolle. Der CCR9-Ligand CCL25 wird von Epithelzellen des Dünndarms insbesondere in Krypten, die sich in der Umgebung MAdCAM-1⁺ Gefäße befinden, gebildet (34-36). Fast alle Lymphozyten im Dünndarm, aber nicht die des Kolons oder anderer extra-lymphatischer Gewebe, exprimieren CCR9 (34, 36).

Th1/Th2-spezifisches Homing

Neben dem organspezifischen gibt es viele Hinweise auf ein zytokinsubpopulationsspezifisches Homing. So gibt es viele entzündliche Infiltrate, die

entweder Th1-oder Th2-dominiert sind, was eine spezifische Rekrutierung dieser Subpopulationen vermuten lässt. In der Tat wurden auf *in vitro* polarisierten Th1- und Th2-Zellen Selektinliganden differentiell exprimiert gefunden, die nur die P-Selektinligand-positive Th1-Subpopulation den Eintritt in die entzündete Haut/das arthritische Gelenk erlaubte (99). Später wurde auch eine Reihe von Chemokinrezeptoren als spezifisch für Th1 bzw. Th2 detektiert. So exprimieren *in vitro* differenzierte Th1-Zellen CCR5 (100-102), CXCR3 (100, 103, 104) und in der Maus zusätzlich CCR7 (76). Th2-Zellen sind dagegen positiv für CCR3 (105), CCR4 (100, 103), CCR8 (106, 107) und nach einem Bericht auch für CXCR4 (108). Entsprechend dieser unterschiedlichen Chemokinrezeptorexpression lassen sich *in vitro* erzeugte Th1-und Th2-Zellen differentiell von Chemokinen anlocken. Über dieses exklusive Rezeptor-Expressionsmuster gibt es, insbesondere was die Expression von CCR7, CCR5 auf Th1 und CCR3, CXCR4 auf Th2 Zellen angeht, viele Kontroversen. In einem Bericht wurde auf IL-10-produzierenden suppressiven T-Zellen selektiv CCR8 exprimiert gefunden, gleichzeitig migrierten die Zellen auch zu dem korrespondierenden Liganden CCL1 (109).

Darüber hinaus sind Th1- bzw. Th2- Zytokine in der Lage, die Expression von Chemokinen anzuregen; so induziert IFN- γ in einer Vielzahl von Zelltypen die drei CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (110-112). Von Th2-Zellen sezerniertes IL-4 und/oder IL-13 induzieren dagegen vom Transkriptionsfaktor STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6) -abhängige Liganden für CCR3, wie CCL11, CCL13 (113), welche eosinophile und basophile Granulozyten bzw. wieder Th2-Zellen anlocken können. Des Weiteren sind polarisierte T-Zellen selbst in der Lage, neben Zytokinen Chemokine zu exprimieren. So produzieren Th1-Zellen CCL1 (114) CCL3, CCL4, CCL5 und XCL1 (115, 116), Th2-Zellen hingegen CCL1 (114, 116) und CCL22 (116). Durch diese Netzwerke ist eine positive Feedbackwirkung gewährleistet und das Entstehen eines Th1- oder Th2-dominierten Infiltrates denkbar.

Ebenso gibt es Berichte, dass Chemokine die Differenzierung in Th1 bzw. Th2 induzieren können (117).

Chemokin-Rezeptorexpression und -Antwortfähigkeit *in vivo* differenzierter polarisierter Th-Zellsubpopulationen

Zur Korrelation von Zytokinsubpopulation und Chemokinrezeptorexpression von Zellen, die direkt aus Tier oder Mensch stammen und in ihrer natürlichen Umgebung differenziert sind, gibt es bisher sehr wenige Untersuchungen.

Da zur Bestimmung des Zytokinsubpopulation T-Zellen aktiviert werden müssen, eine Aktivierung aber innerhalb weniger Stunden die Expressionsprofile vieler Chemokinrezeptorgene bewirkt (118) und auch auf Proteinebene schnell Veränderungen zu detektieren sind (119), ist die Untersuchung erschwert. Dazu kommt, dass nicht für alle Rezeptoren Ak erhältlich sind. So gibt es einzelne Untersuchungen, die auf der Sortierung rezeptorpositiver T-Zellen oder auf Chemokinantwortfähigkeit basieren z.B. für CXCR6 (120), CCR7 (61) und CCR4 (121).

Daneben gibt es sehr wenige Studien, die Zytokinexpression und Chemokinrezeptoranalyse systematisch untersuchten (75, 122-124), wobei diese systematischen Analysen bisher nur im humanen System und ohne Prüfung der Rezeptorfunktionalität vorgenommen wurden.

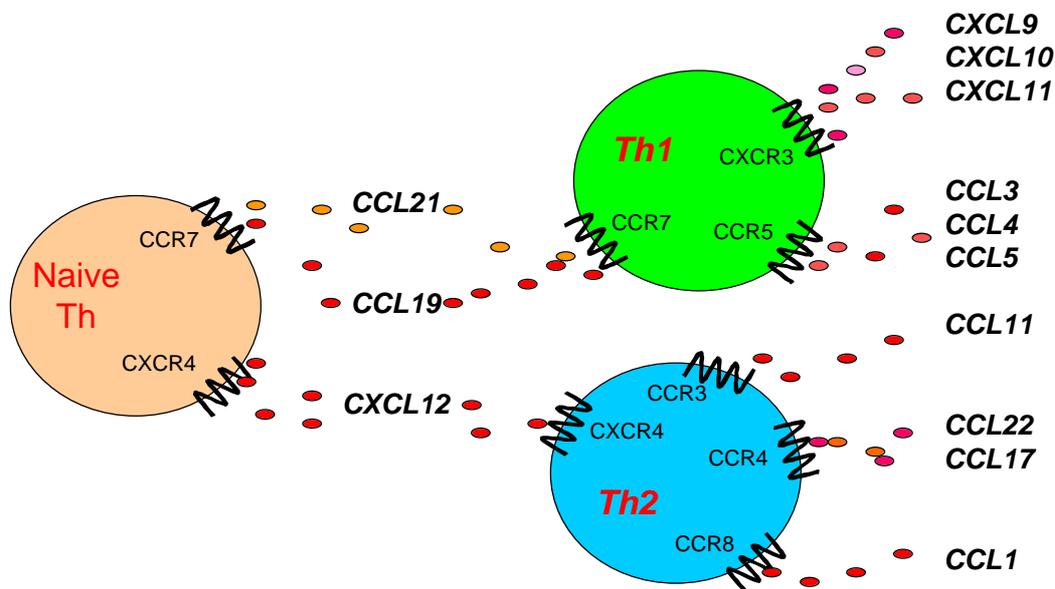


Abbildung 2: Chemokinrezeptorexpression naiver T-Zellen sowie *in vitro* differenzierter Th1- und Th2-Zellen.

1.3.9. Chemokine im Krankheitsgeschehen

Chemokine wirken auf Zellaktivierung und Differenzierung ein, rekrutieren Leukozyten und erfüllen wichtige homöostatische Funktionen. Auf Grund dieser Vielzahl von Eigenschaften spielen sie auch in Krankheitsprozessen eine Rolle. Um einen Eindruck von der potentiellen klinischen Bedeutung dieser Molekülgruppe zu bekommen, soll eine kleine Auswahl von Erkrankungen, in deren Entstehungs- bzw. Aufrechterhaltungsprozess Chemokine beteiligt sind, vorgestellt werden.

Chemokine und Autoimmunkrankheiten

Die klinische Manifestation von Autoimmunkrankheiten ist die Folge einer starken Immunantwort gegen ein Selbst-Ag, die eine Leukozyten-Aktivierung/Ansammlung im Zielorgan und daraus entstehender Pathologie zur Folge hat.

Bei Aktivierung von Lymphozyten durch Selbst-Ag und APC im Zielorgan werden Chemokine und inflammatorische Zytokine (z.B. IFN- γ) gebildet, die eine zytokinabhängige Chemokinfreisetzung zur Folge haben. Hieraus resultiert eine neue Rekrutierung von Leukozyten und das Entstehen eines Teufelskreises.

So werden bei der Multiplen Sklerose (MS) des Menschen und dem Tiermodell für diese Erkrankung, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis), eine Reihe von Chemokinen detektiert:

Die CCR5 Liganden CCL3, CCL4, CCL5 werden verstärkt im ZNS-Gewebe nachweisbar (125). In Zerebrospinalflüssigkeit werden bei akuter MS niedrige Spiegel von CCL2, dafür erhöhte von CXCL10 gefunden. CXCL10 scheint eine besondere Rolle zu spielen, da es von IFN- γ induziert wird, einem Th1-Zytokin, welches in der Progression von MS und EAE eine bedeutende Rolle spielt. CCR2- und CCR1-Liganden scheinen in der Entwicklung dieser demyelinisierenden Autoimmunerkrankungen wichtig zu sein, da EAE in Mäusen, die defizient für einen dieser Rezeptoren sind, nicht auszulösen ist (125).

Auch in der Rheumatoiden Arthritis (RA), eine bei Mensch und Hund vorkommende Erkrankung, wurden erhöhte Spiegel von CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 gefunden. Neben der Anlockung von Leukozyten könnten die hier

exprimierten ELR⁺ CXC-Chemokine (CXCL5, CXCL8) an der Neuvaskularisierung der Gelenke beteiligt sein, die das bei dieser Erkrankung typische infiltrative Wachstum von inflammatorischem Synovialgewebe unterstützen (125).

Eine umstrittene Bedeutung kommt hier CXCL12 und seinem Rezeptor CXCR4 zu. So exprimieren aus RA-Gelenken isolierte T-Zellen vermehrt CXCR4 und auch wird CXCL12 verstärkt von residenten Zellen gebildet (126). Es bleibt jedoch umstritten, ob dieses homöostatische Chemokin an der Rekrutierung von Zellen in Entzündungsgebiete beteiligt ist (125).

Chemokine in Allergie und Asthma

In asthmatischen Erkrankungen bilden Epithelzellen der Atemwege und Alveolarmakrophagen eine Reihe von Chemokinen. Man nimmt an, dass zunächst eosinophile Granulozyten-anlockende Chemokine wie CCL5, CCL7, CCL11 und CCL13 exprimiert werden (127). Nach Anlockung und Degranulation von Eosinophilen, durch frei werdende, epithelschädigende Enzyme werden weitere in dieser Erkrankung detektierbare Chemokine gebildet wie CCL2, CCL3 und CCL5. Ob über CCR3-Liganden auch direkt Th2-Zellen rekrutiert werden können, ist kontrovers, allerdings könnten diese auch über CCL22, was auch von Alveolarmakrophagen gebildet wird, angelockt werden (127). Sind Th2-Zellen in die Atemwege eingedrungen, induzieren sie, durch bei Aktivierung gebildetes IL-4 oder IL-13, STAT-6 abhängige Chemokine wie CCL1, CCL22 und CCL11, die wiederum Th2-Zellen bzw. Eosinophile anlocken.

Somit spielen Th2-Zellen und Chemokine bei Asthma eine Schlüsselrolle in einem Krankheits-aufrechterhaltenden Kreislauf. Im Falle von allergischem Asthma, das über IgE und Mastzellen vermittelt wird, kommt den Th2-Zellen auch eine induktive Rolle zu (s.o.).

Chemokine und Tumorerkrankungen

Eine Reihe von Tumorzellen produzieren Chemokine wie CXCL8, die in einem autokrinen Mechanismus als Wachstumsfaktor für den Tumor selbst wirken (128). Darüber hinaus werden auch andere ELR⁺ Chemokine gebildet, die mit für die Vaskularisierung des Tumorgewebes verantwortlich sein könnten. Interessanterweise konnte aber auch gezeigt

werden, dass die ELR Chemokine CXCL4, CXCL9, CXCL10 durch Hemmung der Angiogenese Tumorwachstum inhibieren können (128).

Daneben gibt es auch Berichte über die funktionelle Expression von Chemokinrezeptoren auf Tumorzellen, die u. a. für Metastasierung in bestimmte Organe/Organkompartimente, wo entsprechende Liganden gebildet werden, verantwortlich sein sollen (129, 130). So wurde im Menschen auf einer Reihe von Tumorzellen insbesondere CXCR4 sowie CCR7 gefunden, deren Liganden bevorzugt in lymphatischen Geweben gebildet werden und über die auch Aktinpolymerisation, sowie Pseudopodienbildung ausgelöst werden konnten (128, 129).

Chemokinrezeptoren und retrovirale Infektionen

Eine Reihe von Lentiviren aus der Familie der *Retroviridae* benutzt Chemokinrezeptoren als Korezeptor, um eine Targetzelle infizieren zu können. Die Funktion als Haupt-Korezeptor wurde in dem Krankheitskomplex AIDS (acquired immune deficiency syndrome, erworbenes Immunschwäche-Syndrom) für CXCR4 und CCR5 für HIV (Humanes Immundefizienz Virus), FIV (Felines IV) und SIV (Simian IV) nachgewiesen (131). Dieser Erkrankungskomplex spielt eine bedeutungsvolle Rolle bei Mensch und Tier (Katze, Rind). Die Wichtigkeit der Chemokinrezeptoren als Korezeptoren für den Zelleintritt des Virus zeigte die Tatsache, dass Menschen, welche die Nullmutante $\Delta 32$ -CCR5 tragen, resistent gegen Infektion mit CCR5-tropfen HIV-Stämmen sind (132).

Chemokinrezeptoren als therapeutisches Target

Die selektive Blockade von Leukozytenrekrutierung in den Entzündungsort durch Hemmung der Bindungsfähigkeit von Chemokinrezeptoren hat sich in einigen Erkrankungsmodellen als effektives Therapeutikum bewährt (133). Hier spielt auch die Blockade der Einwanderung von Th1- oder Th2-Zellen eine Rolle, wobei einige Erkrankungen im entsprechenden Mausmodell bei Fehlen oder Blockade von spezifischen Chemokinrezeptoren nicht ausgelöst werden konnten (133).

Auch die Verhinderung einer weiteren Metastasierung von Tumoren bzw. deren Wachstumshemmung, die bisher im Mausmodell Erfolge zeigte, ist ein wichtiges Indikationsgebiet (129).

Ebenso ist die Hemmung retroviralen Zelleintritts ein wichtiges Feld, was durch Chemokinrezeptorblockade *in vitro* tatsächlich gelang (133). Es ist eine Vielzahl von Nicht-Protein-Molekülen als spezifische Chemokinrezeptorantagonisten für die verschiedenen Indikationsgebiete in der Entwicklung. Eine Reihe dieser Entwicklungen ist auch bereits in Phase I-Versuche des Zulassungsverfahrens von Arzneimitteln eingegangen (133). Anstelle der Blockade von Chemokinrezeptoren sind auch Therapieansätze denkbar, in denen durch Applikation eines Chemokins spezifisch darauf antwortende Lymphozyten in ein Krankheitsareal gelockt werden können. Hier sind Ansätze, wie die differentielle Rekrutierung suppressiv wirkender IL-10 produzierender T-Zellen in eine überschießende Entzündung, oder aber auch das Anlocken zytotoxischer T-Zellsubpopulationen (Th1, CTLs, NK-Zellen), um einen Tumor bzw. Resttumorzellen nach chirurgischer Intervention zu bekämpfen, wobei derartige Tumorbekämpfungsstrategien im *in vivo*-Mausmodell erste Erfolge brachten (129).

2. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Die Balance zwischen Th1- und Th2-Subpopulationen spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunreaktionen. So sind in vielen Krankheitsprozessen Th1- oder Th2-Infiltrate pathogenetisch von Bedeutung. Da es nur wenige Untersuchungen zur differentiellen Chemokinrezeptorexpression *ex vivo* gab, war es Ziel dieser Arbeit aufzuklären, ob bestimmte Chemokinreaktivitätsmuster einem bestimmten Zytokinphänotyp zugeordnet werden können, in der Art wie dies für *in vitro* polarisierte Effektorzellen möglich ist. Die Bedingungen, unter denen eine Zelle *in vivo* ausdifferenziert, scheinen sehr viel komplexer zu sein als die *in vitro* zu imitieren sind. Deshalb ist es eine wichtige Aufgabe zu prüfen, ob sich Ergebnisse, die mit *in vitro* erzeugten Effektorzellen entstanden sind, auf *in vivo* differenzierte Zellen übertragen lassen.

Dies erschien von großer Wichtigkeit, da hier ein Angriffspunkt möglicher Therapien (z.B. Blockade der Einwanderung spezifischer T-Zellsubpopulationen) liegt. Da kaum Ak gegen Chemokinrezeptoren zur Verfügung standen und die reine Oberflächenexpression in vielen Fällen nicht funktionell und deshalb wenig aussagefähig ist, wurde ein funktioneller Ansatz gewählt: In einem Chemotaxisassay wurde das Zytokinprofil reaktiver CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* bestimmt und der Prozentsatz migrierter Zellen einer Zytokinsubpopulation ermittelt. In die Analyse wurden T-Zellen mit der Fähigkeit zur Expression des Th2-Zytokins IL-4, des Th1-Zytokins IFN- γ - und potentiell suppressive IL-10⁺ T-Zellen einbezogen.

Daneben war es Aufgabe das chemotaktische Verhalten von naiven, aktivierten und Effektor/Memory T-Zellen gegenüber Chemokinen, die zum Eintritt in lymphatische Organe notwendig sind, zu vergleichen. Ziel war es hiermit zu überprüfen, ob Effektor/Memory T-Zellen während ihrer Differenzierung tatsächlich die Rezirkulationsfähigkeit naiver T-Zellen komplett verloren haben und nur noch Rezeptoren besitzen, die den Zugang in die Peripherie/Entzündung erlauben.

Schwerpunkt der Arbeit bildete die Analyse der Reaktionsfähigkeit gegen homöostatisch-exprimierte und typische Th1- oder Th2-anlockende Chemokine.