

## 5. Diskussion

### 5.1. Migrationsverhalten von naiven, aktivierten und Effektor/Memory T-Zellen

Zum Auffinden und Vernichten von Eindringlingen und entarteten Zellen patrouillieren Lymphozyten kontinuierlich durch lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe. Zur Wanderung in Gewebe und innerhalb dieser Gewebe sind Lymphozyten mit Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen ausgestattet. Bei Lymphozyten unterscheidet sich grundsätzlich das Wanderungsverhalten zwischen naiven und Ag-erfahrenen Zellen. Naive T-Zellen, die zur Initiierung einer primären adaptiven Immunantwort kontinuierlich zwischen Blut und lymphatischem Gewebe rezirkulieren, benötigen Rezeptoren, die den Eintritt in sekundäre lymphatische Organe erlauben.

So exprimieren naive Lymphozyten typischerweise CD62L, CCR7, CXCR4 und B-Zellen, die CCR7 intermediär exprimieren, zusätzlich CXCR5. Daneben bilden die Expressionmuster der Liganden für CCR7- und CXCR5 die Grundlage der Kompartimentbildung in B- und T-Zone lymphatischer Organe. Entsprechend erlaubt die Expression von CCR7 den Eintritt in die T-Zone, die CXCR5-Expression hingegen führt zu einer Lokalisation in der B-Zone.

Mit Aktivierung einer T-Zelle ändert sich das Rezirkulationsverhalten drastisch. So verliert eine T-Zelle nach *in-vitro*-Stimulation die Fähigkeit, in lymphatische Gewebe einzuwandern und akkumuliert stattdessen in nicht-lymphatischen Organen, wie Lunge und Leber (142). Für diese Veränderung in der Rezirkulationskapazität wird unter anderem der mit Aktivierung einhergehende Verlust der CD62L-Expression verantwortlich gemacht (25, 142, 143). Im Gegensatz dazu wird CCR7 mit zeitlicher Verzögerung hochreguliert (118, 136-138).

Mit der Differenzierung naiver T-Zellen in Effektor/Memory-Zellen, die die Fähigkeit zur B-Zell-Hilfe oder der Sekretion inflammatorischer Zytokine besitzen, erlangen die Zellen die Potenz, in andere Kompartimente wie periphere Gewebe und Entzündungsgebiete einzuwandern. Im Differenzierungsprozess erhalten die Ag-erfahrenen T-Zellen ein neues Repertoire an Adhäsionsmolekülen wie Liganden für E- sowie P-Selektin und Rezeptoren für inflammatorische Chemokine. Gleichzeitig entwickeln sich T-Zellsubpopulationen, die durch die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren mit organspezifischen

Rezirkulationseigenschaften ausgestattet sind und beispielsweise bevorzugt in die Haut oder den Darm einwandern (33). Den Rezirkulationseigenschaften entsprechend werden Effektor/Memory T-Zellen auch noch lange Zeit nach Ag-Kontakt bevorzugt in nicht-lymphatischen Geweben gefunden (144, 145).

Um aus den vielen Geweben wieder über die Lymphknoten und Lymphgefäße in die Blutzirkulation zu gelangen, benutzen Effektor/Memory T-Zellen die afferente Lymphe (146).

Da T-Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 benötigen, um in lymphatische Organe über HEV zu rezirkulieren, wurde der Rezeptor als ein nützlicher Marker für die Einwanderungspotenz in sekundäre lymphatische Organe erachtet.

Hierauf basierte ein von Sallusto et al. entwickeltes Memoryzellkonzept:

Nach Oberflächenfärbung von CCR7 auf Memory T-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>) aus dem humanen peripheren Blut konnten zwei Subpopulationen unterschieden werden: eine CCR7-positive Subpopulation, die nicht in der Lage war, nach polyklonaler Stimulation Zytokine wie IL-4 oder IFN- $\gamma$  zu produzieren („Central-Memory“) und eine CCR7-negative, die alle Zellen enthielt, die diese Zytokine nach Stimulation produzieren konnten oder/und zytotoxische Fähigkeiten hatten (61). Nach diesem weithin akzeptierten Konzept sollten somit T-Zellen mit Effektoreigenschaften nicht die Fähigkeit besitzen, in lymphatische Organe zu rezirkulieren.

In dieser Arbeit wurde analysiert, wie weit sich die Konzepte zur Lymphozytenrezirkulation auf naive, aktivierte und *in vivo* differenzierte Effektor/Memory T-Zellen anwenden lassen, da es zur Expression von Chemokinrezeptoren nur sehr wenige funktionelle Untersuchungen gibt. Die meisten Studien beruhen auf Oberflächenexpressionsanalysen und der Charakterisierung des Migrationsverhaltens *in vitro* aktivierter/polarisierter Zellen.

### **5.1.1. Chemotaxis von naiven, aktivierten und Effektor/Memory T-Zellen zu homöostatisch exprimierten Chemokinen**

*CD4<sup>+</sup> Effektor/Memory T-Zellen migrieren ex vivo zu Liganden von CCR7, CXCR4 und CXCR5*

Für den Eintritt von naiven T-Zellen aus dem Blut in Lymphknoten und Peyer'sche Plaques ist die Expression von CCR7 erforderlich. Inwieweit weitere Chemokinrezeptoren wie z.B.

CXCR5 und CXCR4, die hier für naive B-Zellen funktionell von Bedeutung sind, zusätzlich Rollen übernehmen, ist bisher unklar. Es gibt erste Hinweise, dass zumindest auch CXCR4 auf T-Zellen für den Eintritt über die HEV wichtig sein könnte (74, 147).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine effiziente Migration von Effektor/Memory T-Zellen *ex vivo* im Chemotaxisassay zu den homöostatisch exprimierten Chemokinen CCL19, CCL21, CXCL12 detektiert, während nur eine kleinere Subpopulation zu CXCL13 migrierte (Abb. 12). Somit ähnelte das chemotaktische Verhalten von Effektor/Memory T-Zellen dem für naive Lymphozyten beschriebenen.

Diese Befunde legen den Verdacht nahe, dass *in vivo* differenzierte Effektor/Memory T-Zellen eine ähnliche Kapazität wie naive T-Zellen besitzen, in sekundäre lymphatische Organe zu rezirkulieren.

*Aktivierte und Memory T-Zellen lassen sich effizient von den CCR7-Liganden CCL21 und CCL19 anlocken*

Um weiterhin die Frage zu klären, inwieweit naive oder aktivierte bzw. Memory T-Zellen unterschiedliche Migrationseigenschaften besitzen, wurde die Chemotaxis zu dem CCR7-Liganden CCL21 untersucht.

In der Literatur wurde beschrieben, dass *ex vivo* murine Memory T-Zellen, die durch die Expression von CD44 (62, 135) oder CD62L<sup>low</sup> (62, 72) definiert wurden, deutlich schlechter (festgemacht an einem sehr viel geringeren Prozentsatz) zu den CCR7-Liganden CCL19 oder CCL21 migrieren als naive CD44<sup>low</sup>- bzw. CD62L<sup>high</sup>-exprimierende Zellen.

Die Analysen in der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass wenn CD62L als Marker für naive T-Zellen gewählt wurde, ein höherer Prozentsatz CD62L<sup>high</sup>-exprimierender naiver T-Zellen zu CCR7-Liganden migrierte (ca. 75 % der eingesetzten Zellen) als CD62L<sup>low</sup>-exprimierende Memory T-Zellen (Abb. 7A). Allerdings sind noch über 50 % der eingesetzten CD62L<sup>low</sup> T-Zellen zu CCL21 migriert (Abb. 7A).

Die Unterschiede zwischen naiven und Memory T-Zellen sind somit in dieser Untersuchung weniger prägnant, als sie von anderen Gruppen beschrieben wurden (62, 72, 135). Derartige Differenzen könnten darauf zurückzuführen sein, dass CD62L vielleicht kein zuverlässiger Memorymarker ist, da bereits frisch aktivierte Zellen das Molekül abspalten (25, 143, 148) und humane und murine Memory CD4<sup>+</sup> T-Zellen das Selektin re-exprimieren können (60, 61, 149).

Eine weitere Analyse CCL21-reaktiver Zellen unter Verwendung von CD45RB, der ein zuverlässigerer Memorymarker ist, da sich dessen Expression langsamer verändert, bestätigte allerdings, dass ein annähernd so hoher Prozentsatz CD45RB<sup>low</sup>-exprimierender Memory T-Zellen zu CCL21 migriert wie von CD45RB<sup>high</sup>-exprimierenden naiven T-Zellen (Abb. 7C). Somit zeigen Effektor/Memory T-Zellen eine geringere Chemotaxis zu CCR7-Liganden als naive T-Zellen; die Diskrepanzen zwischen den Populationen fallen in dieser Untersuchung allerdings gering aus.

Trotz der Tatsache, dass *in vitro* aktivierte T-Zellen nicht mehr in lymphatische Kompartimente rezirkulieren, war im humanen System beschrieben worden, dass T-Zellen nach Stimulation CCR7 heraufregulieren und eine verstärkte Antwortfähigkeit gegen CCR7-Liganden besitzen (118, 136-138).

Um dies für *in vivo* voraktivierte murine naive (CD45RB<sup>high</sup>) und Memory (CD45RB<sup>low</sup>) T-Zellen zu überprüfen, wurde die Migrationsfähigkeit gegen CCL21 getestet. Zusätzlich wurden dabei aktivierte und ruhende Zellen dieser Populationen unter Zuhilfenahme des Aktivierungsmarkers CD69 weiter differenziert. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl naive als auch Memory T-Zellen im aktiviertem Zustand (CD69<sup>+</sup>) eine verminderte Antwortfähigkeit zu CCL21 zeigten (Abb. 7C). Dabei fielen die Unterschiede relativ gering aus und die Population mit der geringsten chemotaktischen Antwort migrierte zu CCL21 im Mittel noch zu 50 % (Abb. 7C).

Da CD69 schon wenige Stunden nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert wird und die Expression für einige Tage erhalten bleibt, markiert CD69 ein relativ großes Zeitfenster der Aktivierung. Somit könnten frisch aktivierte T-Zellen CCR7 herunterregulieren und zu einem etwas späteren Zeitpunkt den Rezeptor re-exprimieren. Damit bestünde kein Widerspruch zu den Daten im humanen System, die eine erhöhte Antwortfähigkeit humaner T-Zellen zu CCR7-Liganden erst 72-96h nach Stimulation detektierten (136, 137).

Um die Frage der funktionellen CCR7-Expression auf aktivierten T-Zellen abschließend klären zu können, sind weitere Untersuchungen, insbesondere zur Expressionskinetik *in vivo* aktivierter T-Zellen nötig.

### **5.1.2. Effektor/Memory T-Zellen und CCR7**

Das von Sallusto et al. 1999 vorgeschlagene, unter 5.1. beschriebene Effektor-Memory-Zellkonzept, nach dem T-Zellen mit Effektoreigenschaften CCR7 sind und nur in periphere

Organe rezirkulieren können (61), wurde in mehreren Arbeiten fast zeitgleich, darunter auch in der hier vorliegenden, weiterführender untersucht und in Frage gestellt.

1. So fanden Campbell et al. auf humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die aus verschiedenen gesunden und entzündeten peripheren Organen isoliert wurden, eine deutliche Oberflächenexpression von CCR7 (60), was darauf hinwies, dass die Fähigkeit periphere Organe zu infiltrieren, das Vermögen in lymphatische Gewebe zu rezirkulieren, nicht ausschließt.

2. Kim et al. konnten nach Oberflächenfärbung von CCR7 auf humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut und nach anschließender Stimulation der Zellen die Mehrzahl der Zytokinproduzenten innerhalb der CCR7-positiven Fraktion detektieren (75). Sogar entzündliche Gewebe infiltrierende Effektor/Memory T-Zellen, die aus dem rheumatischen Gelenk isoliert wurden, waren größtenteils CCR7<sup>+</sup> (75).

3. Für humane virusspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche die Potenz zur IFN- $\gamma$ -Produktion besaßen, wurde gezeigt, dass diese CCR7 exprimieren können (150).

4. Im Maussystem fanden Campbell et al., dass P-Selektinliganden-exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche die Fähigkeit zur IFN- $\gamma$ - sowie IL-4-Produktion besaßen und eine DTH auf andere Tiere übertragen konnten, ähnlich gut zu CCL21 migrierten wie naive T-Zellen (77).

5. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte, dass in einem viralen Infektionsmodell murine IFN- $\gamma$ -Produzenten ebenso wie Ag-spezifische CTLs vorwiegend CCR7<sup>+</sup> waren (151).

Die meisten dieser Arbeiten analysierten die Oberflächenexpression von CCR7. Der spezifische Ansatz der hier vorliegenden Untersuchung beruhte dagegen auf funktionellen Analysen zur Klärung der Frage, ob Effektor/Memory T-Zellen funktionelles CCR7 exprimieren und damit die Fähigkeit besitzen, in lymphatische Gewebe zu rezirkulieren.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass der CCR7-Ligand CCL21 in der Lage war, die Mehrzahl aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen anzulocken. Dies galt auch für Zytokinproduzenten, wie weiter unten diskutiert. Nur T-Zellen, die IL-10, nicht jedoch IL-4 oder IFN- $\gamma$  produzieren konnten, zeigten eine geringere Potenz, zu CCL21 zu migrieren.

Allerdings wurde berichtet, dass CCL21 gleichzeitig auch CXCR3 binden und durch diesen Rezeptor Signale vermitteln kann (152, 153). Des Weiteren wurde ein Rezeptor, zunächst „CCR11“ genannt, bei Mensch und Maus beschrieben, der neben CCL19 und CCL25 in der Lage ist CCL21 zu binden (154, 155). Bisher hat der Rezeptor aufgrund eines fehlenden funktionellen Nachweises keinen Zugang in die offizielle Nomenklatur gefunden (37). Um auszuschließen, dass es sich bei der Chemotaxis von Effektor/Memory T-Zellen zu CCL21 um einen durch einen anderen Rezeptor vermittelten Effekt handelte, wurden CCR7-defiziente T-Zellen analysiert.

CCR7-defiziente Effektor/Memory T-Zellen zeigten eine der Basalmigration entsprechende Reaktionsfähigkeit gegenüber CCL21. Ebenso hatten erweiterte Konzentrationsbereiche von CCL19 oder CCL21 weder auf naive noch auf Memory- CCR7<sup>-/-</sup>-T-Zellen eine detektierbare chemotaktische Wirkung (Abb. 13).

Folglich lässt sich ein anderer Rezeptor als CCR7 für die in den Versuchen gemessene Reaktivität von Effektor/Memory T-Zellen zu CCL21 ausschließen.

Als sehr unwahrscheinlich ist die Möglichkeit einzuschätzen, dass CCR7-Defizienz die gleichzeitige Defizienz oder Fehlregulation eines weiteren CCL21-bindenden Rezeptors (z.B. CXCR3, „CCR11“) bedingt, auch wenn ein derartiges Phänomen für CCR4-defiziente Mäuse beschrieben wurde (156).

#### *Effektor/Memory T-Zellen aus Blut und Milz zeigen ein vergleichbares Migrationsverhalten gegenüber dem CCR7-Liganden CCL21*

Eine mögliche Ursache für die Diskrepanzen zu den Ergebnissen von Sallusto et al. (61) lieferte die Erwägung dass CCR7-Expression oder CCR7-Ligand-Funktionalität vom Kompartiment der isolierten Zellen abhängt; so hatten Sallusto et al. alle Untersuchungen ausschließlich mit Lymphozyten aus dem peripheren Blut vorgenommen (61). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit haben sich hingegen nicht nur auf ein Kompartiment beschränkt. So ergaben Experimente der hier vorliegenden Arbeit, dass IL-4, IFN- $\gamma$  oder IL-10-produzierende T-Zellen aus Mäuseblut eine mit Effektor/Memory T-Zellen aus Milzen der gleichen Tiere vergleichbare Potenz zu CCL21 zu migrieren besaßen, (Abb. 15).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten im humanen System von Kim et al., die eine Expression von CCR7 auf der Mehrzahl zytokinproduzierender T-Zellen aus dem entzündetem Gelenk (bei RA) detektieren konnten (75). Somit ist die Chemotaxis von

Effektor/Memory T-Zellen zu CCL21 bzw. die Expression von CCR7 nicht nur auf Zellen aus einem Kompartiment beschränkt.

#### *Humane Effektor/Memory T-Zellen aus dem peripheren Blut migrieren effizient zu CCL19*

Eine weitere mögliche Ursache für die Diskrepanzen zu den Ergebnissen von Sallusto et al. (61) könnten Speziesunterschiede in der CCR7-Expression zwischen Mensch und Maus sein. Daher wurde die Antwortfähigkeit humaner CD4<sup>+</sup> Zytokinproduzenten gegenüber dem CCR7-Liganden CCL19 im Chemotaxisassay überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die Mehrzahl der IL-4 und/oder IFN- $\gamma$ -positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu CCL19 migrierte (Abb. 16). Die Ergebnisse bestätigen die Färbedaten von Kim et al. (75) und stimmen mit den Mausdaten überein, nicht aber mit dem Konzept von Sallusto et al. (61).

#### *Effektor/Memory T-Zellen exprimieren CCR7 heterogen auf der Zelloberfläche*

Die dritte Möglichkeit, der Erklärung der Unterschiede zu den Ergebnissen von Sallusto et al. (61) ergäbe sich wenn Effektor/Memory-Zellen eine niedrige Oberflächenexpression von CCR7 hätten, die aber durchaus funktionell wäre. So ist z.B. für CXCR4 bekannt, dass niedrigere Oberflächenexpression mit einer größeren Reaktivität zu seinem Liganden korrelieren kann (157-159).

Ebenfalls ließen sich hierdurch die Differenzen zu Kim et al. erklären, die unter Umständen die Schwelle für „positiv“ niedriger gesetzt hätten als Sallusto et al., da auch unterschiedliche monoklonale Ak zur Färbung von Oberflächen-CCR7 verwendet wurden (61, 75), die unterschiedliche Färbeeigenschaften haben könnten.

Eine in der vorliegenden Arbeit vorgenommene simultane Analyse von Oberflächen-CCR7 mittels Färbung mit monoklonalem Ak (human) oder markiertem Liganden (murin) und intrazellulärer Zytokinexpression *ex vivo*, nach polyklonaler Stimulation zeigte, dass die Mehrzahl der Zytokinproduzenten positiv für CCR7 ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den funktionellen Daten gegenüber CCR7-Liganden. Allerdings waren die CCR7-Expressionsspiegel im Vergleich zu naiven T-Zellen heterogener, auch korrelierte die Zytokinexpression in gewissen Maße negativ mit der CCR7-Expression, da ein höherer Prozentsatz an Zytokin-positiven Zellen innerhalb der CCR7<sup>-</sup> als in der CCR7<sup>+</sup>

Memoryfraktion zu finden war (Abb. 17, 18). Folglich darf nicht ausgeschlossen werden, dass die Höhe der CCR7-Expression mit einem Aktivierungs- oder Differenzierungsgrad von T-Zellsubpopulationen korreliert.

Allerdings kann aufgrund der Daten aus Literatur (60, 75, 77, 150, 151) und dieser Arbeit CCR7 nicht, wie von Sallusto et al. vorgeschlagen (61), pauschal als Marker für CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Memory T-Zellen ohne Effektoreigenschaften („Central Memory“) dienen, vielmehr exprimiert die Mehrheit der murinen und humanen Effektor/Memory T-Zellen funktionelles CCR7.

### **5.1.3. Die potentielle Bedeutung der Chemotaxis von Effektor/Memory T-Zellen zu homöostatischen/konstitutiv exprimierten Chemokinen**

Konstitutiv exprimierten Chemokinen werden vorwiegend homöostatische Funktionen wie die Lymphozytenrezirkulation und Kompartimentbildung lymphatischer Organe zugeschrieben.

Inwieweit diese homöostatischen Chemokine eine zusätzliche Rolle bei der Einwanderung von Effektor/Memory T-Zellen in Entzündungsgebiete spielen, ist bisher wenig untersucht.

#### *Homöostatische Chemokine und ihre potentielle Rolle der Rekrutierung von Effektor/Memory T-Zellen in Entzündungsregionen*

Da die Untersuchungen dieser Arbeit eine hohe Effizienz von CXCL12 und CCL19/CCL21 in der Anlockung von Effektor/Memory T-Zellen zeigten, erschien eine Funktion in Entzündung nicht unmöglich.

Einige Arbeiten haben gezeigt, dass der CXCR4-Ligand CXCL12 in Entzündung hochreguliert und ihm auch eine Rolle in der Rekrutierung von Effektorzellen zugesprochen wurde (126, 160-162).

CXCL13, der Lymphotoxin-abhängig exprimierte Ligand für CXCR5, der sonst im B-Zell-Follikel lymphatischer Organe exprimiert wird, kann in chronischen Entzündungsgebieten produziert werden und soll hier für die Entstehung ektopischer Lymphfollikelstrukturen verantwortlich sein (163-165).

Auch CCR7-Liganden wurden in entzündlich veränderten Geweben detektiert (164, 166-168), wobei die CCR7-Liganden wahrscheinlich an der Entwicklung HEV-ähnlicher Strukturen in chronischer Entzündung beteiligt sind (164, 166).

Den einzigen Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung für CCR7-Liganden in der Rekrutierung von Effektor/Memory T-Zellen in akuter Entzündung liefert eine aktuelle Arbeit von Itakura et al. (168). Die Autoren beobachteten nach Infektion von Mäusen mit *Propionibacterium acnes* bei einer Blockade von CCL21, das in der Maus konstitutiv peribronchial in der Lunge gebildet wird, neben der Akkumulation von DC und Makrophagen eine Verminderung von T-Zellen im Lungengewebe (168). Obwohl die Autoren die verminderte T-Zellzahl im Lungengewebe auf einen Proliferationsdefekt im regionalen Lymphknoten zurückführen (168), ließe sich der Effekt auch durch eine verminderte T-Zell-Rekrutierung in das entzündete Gewebe erklären.

Wovon der beobachtete Effekt vermittelt wird und inwieweit sich die in diesem Infektionsmodell beobachteten Effekte, von CCL21-Neutralisierung auf Rekrutierung und Infektionsbewältigung, auch auf andere Immunreaktionen/Infektionen übertragen lassen, ist noch zu klären.

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Studie ergaben, dass *in vitro* erzeugte Th1-Zellen unabhängig von CCR7 in eine akute Entzündung einwandern können, da zwischen CCR7<sup>-/-</sup>- und CCR7<sup>+/+</sup>-Th1-Zellen kein Unterschied in der Effizienz, eine DTH-ähnliche Hautentzündung zu infiltrieren, bestand (Abb.19). Obwohl CCR7-Liganden effizient Effektor/Memory T-Zellen anlocken können, scheint CCR7 in diesem Modell keine Rolle in der Rekrutierung dieser Zellen in entzündliche Areale zu spielen. Es sind insbesondere bei der kritischen Betrachtung der Ergebnisse von Itakura et al. (168) noch weitere Studien zur Klärung der Funktion von CCR7 und seinen Liganden in Entzündung nötig.

#### *Homöostatische Chemokine und ihre potentielle Rolle für den Eintritt von Effektor/Memory T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe*

Es ist bekannt, dass naive T-Zellen über CCR7-Interaktion mit auf HEV exprimiertem CCL19 und CCL21 den nötigen Aktivierungsschritt in der Mehrschrittkaskade der Transmigration (siehe Einleitung) für die Einwanderung in Lymphknoten und Peyer'sche Plaques erhalten (58, 59).

Die in dieser Arbeit detektierte hohe prozentuale Chemotaxis von Effektor/Memory T-Zellen zu CCR7-Liganden implizieren eine solche Rolle von CCR7 und seinen Liganden auch für Effektor/Memory T-Zellen.

Unterstützt wird diese Hypothese auch durch eigene Befunde zum Homingverhalten CCR7-defizienter Th1-Zellen, die eine verringerte Potenz besaßen, in Lymphknoten und Peyer'sche Plaques einzuwandern (Abb. 19). Insbesondere bei Peyer'schen Plaques, die keinen Lymphzufluss besitzen, muss die stark verringerte Einwanderung CCR7-defizienter Th1-Zellen darauf zurückgeführt werden, dass HEV nicht ausreichend ohne CCR7 passiert werden konnten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch Effektorzellen CCR7-abhängig über HEV in lymphatische Organe rezirkulieren.

#### *CCR7-unabhängige Rezirkulationsmechanismen von Effektor/Memory T-Zellen*

Inwieweit CXCR4 und CXCR5 (oder andere Chemokinrezeptoren) auf T-Zellen, zusätzlich zu CCR7/CCR7-Liganden, wichtig für die Einwanderung in Lymphknoten und Peyer'sche Plaques sind, wie dies inzwischen für B-Zellen bekannt ist (74), ist noch unklar.

Hinweise auf CCR7-unabhängige Mechanismen liefert die Tatsache, dass Lymphknoten und Peyer'sche Plaques von *plt*- und CCR7-defizienten Mäusen zwar drastisch reduzierte T-Zellzahlen aufweisen, doch nicht frei von T-Zellen sind (68, 69). Daneben wurde für CXCR4 eine zusätzliche Funktion im T-Zell-Eintritt über die HEV gezeigt (74, 147).

Das geringe, aber vorhandene Grundvermögen CCR7-defizienter Th1-Zellen, in sekundäre lymphatische Organe zu rezirkulieren (Abb. 19), weist ebenfalls auf einen CCR7-unabhängigen Mechanismus hin.

Weitere CCR7-unabhängige Mechanismen, in Lymphknoten zu rezirkulieren, finden sich in Entzündung.

In Entzündung sind Lymphknoten in der Lage, inflammatorische Chemokine zu bilden (169). Darüber hinaus können im Tributärgebiet eines Lymphknotens exprimierte Chemokine nach Transport durch Transzytose auf HEV der entsprechenden Lymphknoten erscheinen und zusätzlich zu CCR7-Liganden den aktivierenden Schritt in der Mehrschrittkaskade der Transmigration aus dem Blut erfüllen (169, 170). Durch diese Mechanismen können im Entzündungsfall effizienter Leukozyten auch solche, die normalerweise nicht die Fähigkeit

besitzen HEV zu passieren, vom Blut in den reaktiven Lymphknoten eindringen, um aktiv an der Erregerbekämpfung teilzunehmen.

Der in dieser Arbeit festgestellte geringere Unterschied im Vermögen CCR7-defizienter im Vergleich zu CCR7-wt Th1-Zellen in periphere Lymphknoten einzutreten (Abb.19), lässt sich damit erklären, dass es sich hier um ein Entzündungsmodell handelte, in dem in reaktiven, drainierenden peripheren Lymphknoten wahrscheinlich inflammatorische Chemokine exprimiert wurden, wodurch T-Zellen CCR7-unabhängige Mechanismen benutzen konnten.

Offen bleibt die Frage, ob Effektor/Memory T-Zellen wie DC die CCR7-CCL21-Achse benutzen, um aus peripherem Gewebe über afferente Lymphgefäße drainierende Lymphknoten zu erreichen (66). Alternativ könnte diese Route für T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen unabhängig von CCR7 sein.

#### *Potentielle Funktionen von Effektor/Memory T-Zellen in lymphatischen Organen*

Aufgrund des unerwarteten Ergebnisses, dass nicht nur naive, sondern auch Effektor/Memory T-Zellen effizient zu homöostatischen Chemokinen migrieren, stellte sich die Frage, welche Funktionen Effektor/Memory T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen erfüllen.

Neben ihren Aufgaben in der Erregerabwehr in peripheren Organen und Entzündung erfüllen Effektor/Memory T-Zellen eine Vielzahl von Funktionen in sekundären lymphatischen Organen:

- Sie interagieren mit APC wie DC und B-Zellen.
- Sie leisten B-Zell-Hilfe und induzieren Klassenwechsel zu IgG1 und IgE durch IL-4 zu IgG2a/b durch IFN- $\gamma$  und durch TGF $\beta$  zu IgA (11).
- Darüber hinaus stellt insbesondere IL-4 ein Wachstums- und Überlebensfaktor für T- und B-Zellen dar (12).
- Ebenso wirken von Effektor/Memory T-Zellen exprimierte Zytokine auf die Differenzierung naiver T-Zellen zu polarisierten Subpopulationen (Th1, Th2, Tr1) (11).

Somit bilden in sekundäre lymphatische Organe rezirkulierende Effektor/Memory T-Zellen die Grundlage für eine effektive polarisierte sekundäre Immunantwort.

## 5.2. T-Zell-subpopulationsspezifisches Homing

Für *in vitro* differenzierte Effektorzellen (Th1, Th2) war ein subpopulationsabhängiges chemotaktisches Verhalten gegenüber einer Reihe von Chemokinen durch differentielle Rezeptorexpression beschrieben worden (76, 100-108). Aus dem daraus resultierenden differentiellen Homingverhalten wurde eine Akkumulation von Th1- oder Th2-Zellen in entzündlichen Prozessen erklärt. Da Th1- oder Th2-Zellen in vielen Entzündungsprozessen pathogenetisch von Bedeutung sind, stellt die differentielle Chemokinrezeptorexpression einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt dar.

Außerhalb von Entzündungssituationen wurde gezeigt, dass die größere Potenz zur B-Zell-Hilfe *in vivo*, durch *in vitro* differenzierte Th2-Zellen, im Gegensatz zu Th1-Zellen, auf Unterschiede in der Chemotaxis zu CCR7-Liganden zurückzuführen sind (76).

Neben den klassischen Th1- und Th2-Zellen wurde für eine andere, *in vivo* differenzierte, funktionelle T-Zellsubpopulation, nämlich die folliculären T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>), ein spezifisches Migrationsverhalten nachgewiesen (79, 80, 82).

Im Folgenden soll zunächst auf differentielle Chemotaxis zwischen T-Zellsubpopulationen, die homöostatische Funktionen erfüllen, eingegangen werden. In einem weiteren Abschnitt folgt Th1- bzw. Th2-spezifische Chemotaxis in Entzündungssituationen.

### 5.2.1 Subpopulationsspezifische Migration zu in lymphatischen Organen exprimierten Chemokinen

*Im Gegensatz zu in vivo vorkommenden Effektor/Memory T-Zellen zeigen in vitro erzeugte Th1-Zellen gegenüber Th2-Zellen eine verstärkte CCR7-Oberflächenexpression und Migration zu CCL21*

In einer Studie von Randolph et al. wurde gezeigt, dass murine naive und Th1- Zellen, im Gegensatz zu Th2-Zellen, CCR7 exprimieren (76). Diese differentielle CCR7-Expression von *in vitro* erzeugten Th1- und Th2-Zellen führte zu einer unterschiedlichen Zellverteilung *in vivo*. So verteilten sich Th1 und naive T-Zellen nach Transfer in die T-Zone, während Th2-Zellen die Fähigkeit besaßen den B-Zell-Follikel zu erreichen. Die unterschiedliche

Verteilung ging mit einer unterschiedlichen Potenz zur B-Zell-Hilfe einher. So waren nur die Th2-Zellen in der Lage, effizient B-Zellen zu aktivieren und Ig-Sekretion zu induzieren (76). Diese Fähigkeit war abhängig von der Nichtexpression von CCR7, da nach CCR7-Transfektion der Th2-Zellen diese Eigenschaft verloren ging und gleichzeitig zu einer Verteilung in die T-Zone führte (76).

Im Gegensatz dazu ließen sich in einer Studie von D'Ambrosio (171) zwischen *in vitro* kultivierten humanen Th1- und Th2- Zellen keine Unterschiede in der CCR7-Expression detektieren. Durch die Diskrepanzen zwischen den beiden Studien wird die Wichtigkeit von Untersuchungen zur Chemokinrezeptorexpression bzw. Chemokinreaktivität von *in vivo* entstandenen Zytokinproduzenten, wie in dieser Studie vorgenommen, unterstrichen.

Im Einklang mit von Randolph et al. veröffentlichten Ergebnissen exprimierten in den durchgeführten Versuchen der hier vorliegenden Arbeit *in vitro* erzeugte Th1-Zellen mehr CCR7 als Th2-Zellen (76), Abb. 14). Auch auf funktioneller Ebene ließen sich diese Unterschiede bestätigen. So migrierten 85 % der Th1-, aber nur 55 % der Th2-Zellen. Insofern waren die Unterschiede zwischen Th1 und Th2 vorhanden, aber schwächer ausgeprägt als bei Randolph et al. (76).

Im Gegensatz dazu besteht *ex vivo* in der CCR7-abhängigen Reaktivität zu CCL21 kein Unterschied zwischen IL-4 oder IFN- $\gamma$ - produzierenden T-Zellen (Abb. 11).

#### *Migration von Effektor/Memory T-Zellsubpopulationen zu dem im B-Zellfollikel exprimierten CXCL13 ist abhängig von Immunisierung*

Für CXCL13 war beschrieben worden, dass über seinen Rezeptor CXCR5 neben B-Zellen auch eine kleine Subpopulationen von Memory T-Zellen angelockt werden konnte (79, 80, 83). Im humanen System zeigte sich, dass im B-Zellfollikel ansässige CXCR5<sup>+</sup> T- Zellen aus der Tonsille *in vitro* B-Zell-Hilfe geben können, weshalb sie den Namen T<sub>FH</sub> (follikuläre T-Helferzellen) erhielten (79, 80).

Obwohl Th-Funktionen klassischerweise mit dem Th2-Phänotyp assoziiert werden, leisteten T<sub>FH</sub> die B-Zell-Hilfe unabhängig von Th2-Zytokinen. Zytokinexpressionsanalysen zeigten nämlich, dass viele dieser Zellen IL-10 und nur sehr wenige IL-4, IL-5, oder IFN- $\gamma$  exprimierten (79, 80, 82). Es wurde angenommen, dass neben IL-10 Oberflächenmoleküle

wie ICOS und CD40L eine funktionelle Rolle in der B-Zell-Hilfe durch  $T_{FH}$  spielen (79, 80, 82).

In Übereinstimmung mit den Daten aus dem humanen System zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass murine IL-10 einfach-positive T-Zellen eine gute Antwortfähigkeit zu CXCL13, dem bisher einzigen bekannten Liganden für CXCR5, besitzen (Abb. 11). Es ist denkbar, dass diese Zellen über CXCR5 in den Follikel (bzw. GC) gelangen, dort B-Zell-Hilfe leisten und IL-10 dabei eine bedeutende Rolle zukommt, insofern als sich IL-10 zusätzlich zu seinen suppressiven Wirkungen auf andere Zelltypen, stimulierend auf B-Zellwachstum, -Überleben, Plasmazelldifferenzierung und Klassenwechsel auswirkt (13).

Die verminderte Chemotaxis IL-10 einfach-positiver T-Zellen zu CCL21 bei gleichzeitig bestehender CXCL13-Reaktivität passt in das Konzept, dass bei Hochregulation von CXCR5 CCR7 herunterreguliert werden muss, um die T-Zone zu verlassen und in den B-Zellfollikel zu gelangen (73, 89).

Andererseits zählen IL-10 einfach-positive T-Zellen zu der Tr1-Subpopulation, von der man annimmt, dass sie suppressive Eigenschaften besitzt (10). Inwieweit CXCL13 in der Unterdrückung von Immunreaktionen durch Anlockung von Tr1-Zellen eine Rolle spielt, bleibt eine offene, interessante Frage.

Überraschenderweise zeigten IL-4<sup>+</sup> T-Zellen nach Ova/Alum-Immunisierung eine effiziente Chemotaxis zu CXCL13 (Abb. 11), was vermuten lässt, dass unter Stimulationsbedingungen Zellen mit Th2-Phänotyp doch CXCR5 exprimieren können.

In dem verwendeten Immunisierungsprotokoll entstehen zu über 90 % spezifische Ak vom IL-4 induzierten Isotyp IgG1 (R.A. Manz, persönliche Mitteilung).

Obwohl nicht bekannt ist, wie viele der IL-4<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich Ova-spezifisch sind, liegt der Gedanke nahe, dass diese Zellen nach Aktivierung CXCR5 exprimieren, in den Follikel und GC wandern, dort B-Zellen aktivieren und einen Klassenwechsel zu IgG1 induzieren.

Untersuchungen humaner und muriner CXCR5<sup>+</sup> T-Zellen konnten zeigen, dass die Expression dieses Rezeptors nur transient erfolgen kann (81-83, 85). Somit ist es denkbar, dass IL-4-produzierende T-Zellen nur nach Aktivierung eine vorübergehende CXCL13-Reaktivität besitzen und deshalb zu anderen Zeitpunkten nicht detektierbar sind.

Die Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit zeigen die Notwendigkeit, das bisherige  $T_{FH}$ -Konzept zur B-Zell-Hilfe zu überdenken, da bisher IL-4-Produzenten die Fähigkeit zur

CXCL13-Reaktivität abgesprochen wurde (79, 80, 82). Somit sind vielleicht doch T-Zellen mit Th2-Phänotyp die „echten“ B-Helferzellen, die transient nach Aktivierung CXCR5 exprimieren, in den Follikel einwandern, um dort B-Zell-Hilfe zu leisten, und zu einem späteren Zeitpunkt den Follikel wieder verlassen oder sterben.

Gleichzeitig ist es interessant zu prüfen, ob in IFN- $\gamma$  dominierten Immunreaktionen Zellen vom Th1-Phänotyp CXCL13-Reaktivität erlangen, um im Follikel B-Zellen zu einem Klassenwechsel zu IFN- $\gamma$  induzierten Isotypen wie IgG2b zu veranlassen.

Um die Fragestellung bezüglich der Zytokinproduktion durch B-Helfer-T-Zellen zu klären, werden in Zukunft noch eine Reihe von Untersuchungen nötig sein.

### **5.2.2. T-Zell-subpopulationsspezifische Migration zu potentiell in Entzündung exprimierten Chemokinen**

*CXCL12 zeigt keine Präferenz bestimmte Zytokin-subpopulationen anzulocken*

Der CXCR4-Ligand CXCL12, eigentlich ein konstitutiv exprimiertes Chemokin, soll neben seinen homöostatischen Funktionen in der Attraktion inflammatorischer T-Zellen in das entzündete Gelenk bei RA (126, 160), Kollagen-induzierter Arthritis (162) und bei allergischen Lungenentzündungen eine Rolle spielen (161). Diese Erkrankungen sind entweder von Th1- oder Th2-Infiltraten dominiert. Darüber hinaus konnte für CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden, dass CXCL12 kostimulatorisch auf Proliferation und Zytokinproduktion (172, 173) sowie positiv auf Zellüberleben wirkt (173). Diese Eigenschaften könnten ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen spielen.

Während unter anderem die Expression von CXCR4 durch IL-4 induziert werden kann, wurde gleichzeitig von Jourdan et al. eine präferentielle Expression von CXCR4 auf Th2-Zellen beschrieben (108).

Aufgrund dieser Befunde war es von besonderem Interesse zu prüfen, ob CXCL12 die Präferenz besitzt, eine spezifische Zytokin-produzierende Subpopulation von T-Zellen anzulocken. Die Versuche in der hier vorliegenden Arbeit detektierten allerdings keine solche Präferenz von CXCL12.

CXCL12 wurde bisher als einziger Ligand für CXCR4 beschrieben und die Tatsache, dass Mäuse, die defizient in einem der beiden Moleküle sind, einen ähnlichen Phänotyp besitzen, macht die Existenz eines weiteren Liganden unwahrscheinlich. Somit kann die von Jourdan et

al. beschriebene präferentielle Expression von CXCR4 auf Th2-Zellen (108) nicht bestätigt werden, da IL-4 und IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen in der vorliegenden Studie gleichermaßen gut zu CXCL12 migrierten. Weil bekannt ist, dass die Höhe der CXCR4-Expression nicht immer mit Funktionalität korreliert (157-159), sind die Ergebnisse allerdings nicht direkt mit der Studie von Jourdan et al. (108) zu vergleichen.

Ob CXCL12 tatsächlich ursächlich an der selektiven Einwanderung einer spezifischen Subpopulation (Th1 oder Th2) in ein Entzündungsgebiet von Bedeutung sind, erscheint also fraglich. Da alle Zytokinsubpopulationen äußerst effizient zu CXCL12 migrierten, ist es denkbar, dass der Ligand eine entscheidende Rolle in der subpopulationsunabhängigen Rekrutierung von Effektor/Memory T-Zellen in Entzündungsgebiete übernimmt.

#### *CCL17 wirkt präferentiell auf IL-4-produzierende T-Zellen*

Für CCR4 sind bisher 2 Liganden bekannt: CCL17 und CCL22. CCR4 wurde als einer der Th2-spezifischen Chemokinrezeptoren im Menschen beschrieben (100, 103, 123) und eine Untersuchung CCL22-reaktiver Zellen *ex vivo* hatte eine Anreicherung IL-4 positiver T-Zellen nachgewiesen (121). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13, STAT6-abhängig, eine Induktion von CCR4-Liganden bewirken können (91, 113, 121).

Inzwischen ist klar, dass, *ex vivo*, auch humane IL-4/IFN- $\gamma$ -Doppelproduzenten CCR4<sup>+</sup> sein können, ebenso Memory T-Zellen, welche negativ für die Produktion von Zytokinen sind oder nur IFN- $\gamma$  sekretieren können (75, 174). Daher scheint CCR4 kein Marker für Th2-Zellen zu sein, auch wenn seine Expression mit der Fähigkeit zur IL-4 Produktion korreliert. In der Maus gab es bisher nur sehr wenige Untersuchungen : So wurde unter anderem die CCL17-Antwortfähigkeit in Abhängigkeit vom Analysezeitpunkt durch *in vitro* differenzierte Th1- und Th2-Zellen analysiert (134, 175).

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit stellen die erste Analyse zur Antwortfähigkeit von Effektor/Memory T-Zellen auf einen CCR4-Liganden *ex vivo* in der Maus dar. Es migrierten nur IL-4 einfach- oder IL-4/IFN- $\gamma$ -doppelt-positive T-Zellen zu CCL17 (Abb. 23). Es migrierten maximal 40 % der eingesetzten IL-4-Produzenten und eine Reaktion anderer Zytokinproduzenten war nur marginal vorhanden. Interessanterweise reagierten IL-10<sup>+</sup> T-Zellen nicht, auch wenn diese manchmal der Th2-Subpopulation

zugeordnet werden. Ebenso wenig Einfluss hatte eine Immunisierung, die zur Vermehrung aktivierter T-Zellen führte, auf das Antwortprofil reaktiver Zellen (Abb. 23).

Somit zeigte diese Analyse, dass tatsächlich murine IL-4<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo*, im Gegensatz zu anderen Zytokinsubpopulationen, eine chemotaktische Präferenz für CCR4-Liganden besaßen und unterstützt damit Berichte, die CCR4 als Th2-spezifisch einordnen. CCL17 erwies sich in der vorliegenden Arbeit als das für eine bestimmte Zytokinsubpopulation selektivste Chemokin.

Allerdings muss beachtet werden, dass die in Th2-Kulturen nicht auftretenden IL-4/IFN- $\gamma$ -Doppelproduzenten eine ähnliche Reaktivität besaßen.

Als mögliche Erklärung für die Migration von IL-4/IFN- $\gamma$ -Doppelproduzenten zu CCL17 kommt eine unter IL-4-Einfluss stattfindende TCR-Aktivierung „junger“, noch nicht vollständig polarisierter IFN- $\gamma$  Produzenten in Frage, die dann in ihrem weiteren Leben IFN- $\gamma$  und IL-4, bei gleichzeitiger CCR4-Expression produzieren.

Die Annahme, dass CCR4-Liganden, die vielfach in allergischen Atemwegserkrankungen wie Asthma detektiert wurden (127, 176-178), eine bedeutende Rolle in der Rekrutierung von Th2-Zellen an den Entzündungsort spielen, wird durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie unterstützt. Zur Verfolgung dieser Hypothese müssten T-Zellen, die die Fähigkeit besitzen in Atemwege einzudringen, auf ihre CCL17-Reaktivität untersucht werden.

Allerdings haben Analysen der CCR4-defizienten Maus im Asthmodell keinen Effekt auf die Rekrutierung von Lymphozyten in die Atemwege nachweisen können (156). Doch selbst wenn CCR4 in dieser Erkrankung eine redundante Rolle einnähme, könnte der Rezeptor ein wichtiges, potentiell therapeutisches Target sein, wenn man an eine kombinierte Hemmung mehrerer Rezeptoren denkt.

Alternativ wurde CCR4 als spezifisch für in die Haut einwandernde T-Zellen beschrieben (95). Insofern stellte sich die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Fähigkeit von CCL17, präferentiell IL-4<sup>+</sup> T-Zellen anzulocken, einen Widerspruch hierzu darstellt. Es wurden zwar 40 % der IL-4<sup>+</sup> T-Zellen von CCL17 angelockt, doch machen IL-4-Produzenten aufgrund ihrer relativ geringen Frequenz nur einen Teil der migrierenden Zellen aus.

Möglicherweise „versteckt“ sich z.B. unter den „Nichtproduzenten“ eine Population hautspezifischer T-Zellen, die wegen ihrer relativ geringen Frequenz in den Analysen untergegangen ist. Somit ist es nicht auszuschließen, dass CCL17 sowohl IL-4-Produzenten als auch hautspezifische T-Zellen anlockt.

Daneben besteht die Möglichkeit, dass beide Fähigkeiten von CCL17 zusammenwirken, wenn das Chemokin, insbesondere bei Th2-dominierten allergischen Hautentzündungen wie atopischer Dermatitis IL-4<sup>+</sup> T-Zellen in die Haut lockt (177).

Innerhalb sekundärer lymphatischer Organe ist die Migrationsfähigkeit zu CCR4-Liganden für die Interaktion zwischen T-Zellen und CCL17/CCL22-exprimierenden DC (134, 179-181) oder B-Zellen (182) mitverantwortlich. So wurde beispielsweise gezeigt, dass CCL22-Produktion *in vitro* zu einer festen Bindung zwischen Ag-erfahrener T-Zelle und DC führt (183). Man kann vermuten, dass eine dort stattfindende IL-4-Produktion dann positiv auf B-Zell-Wachstum wirkt und eine Differenzierung sowie einen Klassenwechsel zu IgG1 und/oder IgE induziert.

#### *CXCL9 lockt präferentiell IFN- $\gamma$ -produzierende T-Zellen an*

Im humanen System wurde der korrespondierende Rezeptor für CXCL9, nämlich CXCR3, als ein auf präferentiell *in vitro* differenzierten Th1-Zellen exprimierter Rezeptor beschrieben (100, 103). Erste *ex vivo* Untersuchungen hatten eine weniger strikte Korrelation ergeben; vor allem färbten auch Th0-Zellen (IL-4/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) aus dem humanen peripheren Blut und arthritischen Gelenk zu einem großen Prozentsatz positiv für CXCR3 (75, 124).

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Studie zur Attraktion durch den von IFN- $\gamma$ -induzierbaren CXCR3-Liganden CXCL9 führten zu ähnlichen Ergebnissen im Maussystem: die Mehrzahl der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen migrierte unabhängig davon, ob IL-4 oder IL-10 koexprimiert wurde (Abb. 23).

Gleichzeitig war CXCL9 aber auch in der Lage, ca. 40 % der IL-4 oder IL-10 einfach-positiven T-Zellen anzulocken. Dieser Umstand weist auf eine Präferenz, jedoch keine Ausschließlichkeit hin IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen anzulocken. Also besaß CXCL9 eine ähnliche Effizienz, wie CCL17, in der Anlockung IL-4 einfach-positiver T-Zellen. Unter Umständen handelt es sich hierbei um überlappende Populationen (, die gleichzeitig CCR4<sup>+</sup> bzw. CCL17-reaktiv sind), wie im humanen System beschrieben (75). Bei CXCL9-reaktiven, IL-10-einfach-positiven Zellen kann es sich nicht gleichzeitig um CCL17-reaktive Zellen handeln, da dort IL-10<sup>+</sup> Zellen nicht reagierten. Folglich ist CXCL9 kein eindeutiges „Th1-Chemokin“.

Der Befund, dass zu CXCR3-Liganden auch als Gegenspieler zu IFN- $\gamma$  geltende Subpopulationen, wie IL-4- und insbesondere IL-10-produzierende T-Zellen migrierten, könnte für Therapien von Bedeutung sein, die auf einer Blockade von CXCR3 beruhen. Denn dadurch würden gleichzeitig potentiell auf den Erkrankungsprozess suppressorisch wirkende T-Zellsubpopulationen an ihrer Einwanderung und Funktion gehemmt.

Erste Hinweise dafür, dass es sich bei der Chemotaxis zu CXCR3-Liganden um stabile Eigenschaften der T-Zellsubpopulationen handelt, liefert die Tatsache, dass das Migrationsprofil auch nach Immunisierung erhalten blieb. Zur weiteren Abklärung sind allerdings Untersuchungen an T-Zellen aus anderen Organen/Entzündungsmodellen nötig.

#### *Nur in vitro differenzierte Effektorzellen migrieren zu Liganden von CCR5*

Die beiden CCR5-Liganden CCL3 und CCL4, die spezifisch humane (100, 102) sowie murine (101) *in vitro* differenzierte Th1-Zellen anlockten, wirkten auch in den der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen chemotaktisch auf *in vitro* differenzierte Effektorzellen (Abb. 21A). CCR5 wurde häufig im Zusammenhang mit humanen autoimmunen Th1-dominierten Infiltraten detektiert und ist deshalb als therapeutisches Target von Interesse (125, 184).

Inzwischen zeigten Analysen der CCR5-Oberflächenexpression und intrazellulärer Zytokinfärbung von humanen T-Zellen aus dem peripheren Blut, dass ca. 50 % der IFN- $\gamma$ -Produzenten CCR5<sup>+</sup> sind, aber auch viele IL-4/IFN- $\gamma$ -doppelt-positive T-Zellen den Rezeptor exprimieren (75, 123). Folglich eignet sich CCR5 nicht als Marker für IFN- $\gamma$ -Produzenten. In den eigenen *ex-vivo*-Untersuchungen in der Maus ließ sich keine Reaktivität von CCL3 oder CCL4 auf T-Zellen detektieren (Abb. 20B, C). Dementsprechend blieb eine FACS-Färbung von CCR5 ohne Erfolg, obwohl andere Arbeitsgruppen CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in der Mäusemilz detektieren konnten (185). Es kommen einige Erklärungsmöglichkeiten für das Ergebnis in Frage:

1. Unterschiede im Mausstamm können Einfluss auf die Expression von CCR5 haben. So soll beispielsweise der verwendete Mausstamm BALB/c- nur halb so viele CCR5<sup>+</sup> T-Zellen besitzen wie C57BL/6-Mäuse, bei denen ca. 9 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut positiv für CCR5 färbten (185). Infolgedessen könnte eine derartige niedrige Frequenz leicht an das

Detektionslimit eines Chemotaxisassays bzw. einer FACS-Färbung reichen, wenn gute Färbekits nicht verfügbar sind.

2. Es ist bekannt, dass CCR5 sehr schnell nach Ligandenbindung internalisiert wird und damit funktionell nicht mehr auf der Oberfläche vorhanden ist (185, 186). Da viele Lymphozyten in lymphatischen Organen zur CCR5-Liganden-Produktion fähig sind und es bekannt ist, dass bereits geringe Mengen IL-12 ausreichen, um die Synthese von CCL3/CCL4 zu induzieren (186), könnte eine solche Desensibilisierung bereits *in vivo*, vor Zellgewinnung, abgelaufen und der Rezeptor wurde bis zum Analysezeitpunkt nicht wieder re-exprimiert worden sein.

3. Die Expression von CCR5 könnte kompartimentabhängig sein. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass insbesondere mukosale T-Zellen bei Mensch und Affe CCR5 exprimieren, T-Zellen des peripheren Blutes, der Lymphknoten und der Milz hingegen kaum (187, 188). Insofern ist es nicht verwunderlich, wenn auch in der Mäusemilz CCR5<sup>+</sup> bzw. CCR5-Liganden-reaktive T-Zellen unterhalb des Detektionslimits lägen.

4. Der Rezeptor CCR5 wurde häufig in Entzündungssituationen detektiert (184). Daraus könnte man schließen, dass seine Expression an eine bestimmte Situation geknüpft ist und z.B. nur in Abhängigkeit eines bestimmten proinflammatorischen Zytokinmilieus oder in Aktivierung hochreguliert ist. Da nur Zellen aus Mäusen in Homöostase und nach Immunisierung analysiert wurden, ist es möglich, dass ein solcher Zustand nicht vorlag.

Die Expression von funktionellem CCR5 durch die Mehrzahl IFN- $\gamma$ -produzierender T-Zellen aus der Mäusemilz kann durch die vorliegenden Ergebnisse, mit Ausnahme einer möglichen Liganden-induzierten Rezeptorinternalisation, ausgeschlossen werden.

#### *Murine Effektor/Memory T-Zellen migrieren nicht zu biologisch aktiven CCL11*

Der CCL11-Rezeptor CCR3 wurde als ein Marker für humane Th2-Zellen beschrieben (105). In der Maus sind bisher keine Daten bezüglich der Expression dieses Rezeptors auf T-Zellen verfügbar und auch im humanen System ist die Expression von CCR3 auf Th2-Zellen inzwischen umstritten (75, 123, 124, 178, 189). Die eigenen Untersuchungen zeigten weder eine Migration von T-Zellen aus der Mäusemilz noch eine Chemotaxis von *in vitro* polarisierten Th2-Zellen zu CCL11 (Abb. 20B, 21A). Sogar T-Zellen aus einem Th2-dominierten Lungeninfiltrat besaßen nicht die Fähigkeit, gegen CCL11 zu migrieren (Abb. 21B), während eosinophile Granulozyten, die zusammen mit den Lymphozyten isoliert

wurden, hierzu in der Lage waren (nicht gezeigt). Aufgrund dieser Daten kann die funktionelle Expression von CCR3 auf murinen Th2-polarisierten Zellen ausgeschlossen werden.

#### *Zu CCL1, CCL2, CCL20 und XCL1 ist keine Chemotaxis detektierbar*

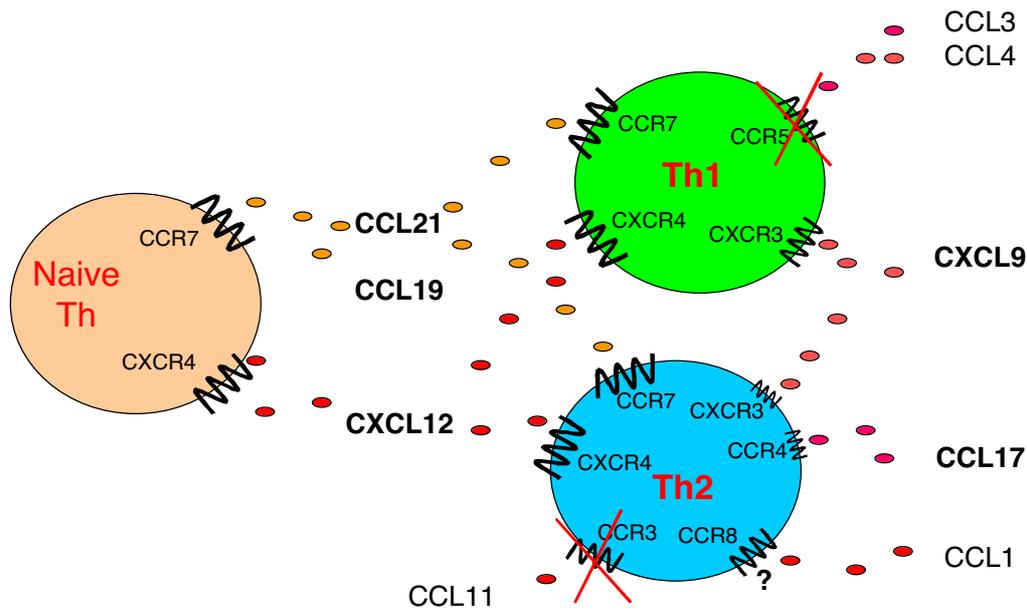
Die Versuche ergaben für CCL1, CCL2, CCL20 und XCL1 keinen bzw. nur einen marginalen chemotaktischen Effekt auf murine CD4<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo*. Da keine Positivkontrollen zur Verfügung standen, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Chemokine keine biologische Aktivität besaßen. Darüber hinaus ist es möglich, dass wirksame Konzentrationen außerhalb des Titrationsbereiches lagen. Somit können die Ergebnisse nicht in eindeutiger Weise interpretiert werden.

### **5.3. Schlussfolgerung**

Diese Studie zeigt, dass Effektor/Memory T-Zellen entgegen früherer Dogmen, mit universellen Migrationskapazitäten ausgestattet sind: Neben der Fähigkeit, über die Expression von Rezeptoren für inflammatorische Chemokine in periphere/inflammatorische Gewebe einzudringen, werden gleichzeitig Rezeptoren exprimiert, die sonst auf naiven T-Zellen zu finden sind und die Rezirkulation in lymphatische Gewebe erlauben.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *in vivo* differenzierte Effektor/Memory T-Zellen durchaus subpopulationsabhängige Präferenzen für inflammatorische Chemokine besitzen. Die Reaktivität von Effektor/Memory T-Zellen *ex vivo* zu Chemokinen erscheint komplexer als die von *in vitro* differenzierten Effektorzellen. Die Migrationsmuster sind weniger eindeutig mit einem Zytokinphänotyp assoziiert, wobei die Analysen kein absolut Th1- oder Th2- spezifisches Chemokin ergaben. Somit erscheinen durch Kultivierung gewonnene Effektorzellen als wenig repräsentativ für Effektor/Memory T-Zellen, die in ihrer natürlichen Umgebung differenzierten.

Übersetzt man die Reaktivität zu einem Chemokin mit der Expression des (Haupt-) Rezeptors, so stellt Abb. 24 eine Zusammenfassung der Analysen dar.



**Abbildung 24: Zusammenfassung der im Rahmen der Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse zur Chemokinreaktivität und zur daraus resultierenden, wahrscheinlichen Chemokinrezeptorexpression von murinen Effektor/Memory T-Zellen *ex vivo*.**

Th1 bzw. Th2 symbolisieren IFN- $\gamma$ - bzw. IL-4-einfach-positive T-Zellen *ex vivo*. Die Größe der eingezeichneten Rezeptoren spiegelt die Häufigkeit wider, mit der sie von den einzelnen Subpopulationen exprimiert werden. Bei durchgestrichene Rezeptoren, konnte keine Aktivität zu biologisch aktiven Liganden detektiert werden.

Es bleibt immer noch die Frage ungeklärt, wie Th1- oder Th2-dominierte Infiltrate entstehen. Geht man von einer differentiellen Rekrutierung der Subpopulationen aus, so bietet die Expression von Chemokinrezeptoren nur einen Erklärungsansatz, denn auch durch andere differentiell exprimierte Moleküle (z.B. Adhäsionsmoleküle wie Selektinliganden) könnte eine spezifische Einwanderung von Subpopulationen möglich sein. Ein weiterer Erklärungsansatz besteht darin, dass möglicherweise ein Th1- oder Th2-dominiertes Infiltrat über eine lokale Proliferation und Differenzierung einer bestimmten Subpopulation zustande kommt.

Es werden noch zahlreiche Untersuchungen vorgenommen werden müssen, um die Komplexität des Chemokinsystem in seiner Gesamtheit zu erfassen. Diese Studie liefert einen kleinen Beitrag zum Verständnis, wie T-Zellsubpopulationen über Chemotaxis in lymphatische Organe, zu APC oder in entzündliche Regionen gelockt werden könnten und liefert dadurch Anhaltspunkte für Therapiekonzepte Th1- oder Th2-dominierter Erkrankungen.

Wie weit sich die Ergebnisse von der Maus auf den Menschen oder unsere Haussäugetiere übertragen lassen und ob sich die unter homöostatischen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse auch auf Zellen, die aus anderen gesunden oder erkrankten Organen stammen, anwenden lassen, muss in Zukunft geklärt werden.

Es wird weiterhin noch viel Arbeit investiert werden müssen, um die Datenflut aus Untersuchungen zur Biologie der Chemokine für das Verständnis physiologischer oder pathophysiologischer Vorgänge bei Mensch und Tier übersetzen und nutzen zu können.