Aus der Abteilung für Nephrologie/Osteologie der Medizinischen Universitätsklinik des
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Leiter Prof. Dr. R. A. K. Stahl

T-Helferzellen vom Th1 / Th2 – Typ:
Chemokin-induzierte Chemotaxis und Chemokinrezeptor-Expression

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Jens Thomas Siveke
aus Hamburg

Hamburg, 2001

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 4

1.1 Th1- und Th2-Zellen als polarisierte Effektorzellen der Immunantwort 6

1.2 Das Multi-Step-Modell: Homing von Lymphozyten als aktiver sequentieller Prozess 8

1.3 Selektine und ihre Liganden 11

1.4 Integrine und ihre Liganden 12

1.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren 16

1.6 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit 26

2. Material und Methoden 28

2.1 Material 28

2.1.1 Geräte 28

2.1.2 Zytokine und Antikörper 28

2.1.3 Primersequenzen 29

2.1.4 Zusammensetzung verwendeter Lösungen 30

2.2 Methoden 32

2.2.1 Entnahme von Lymphozyten aus peripheren und mesenterialen Lymphknoten der Maus 32

2.2.2 T-Zell-Separation über Panning 32

2.2.3 *In vitro* Generation von Th1- und Th2-Lymphozyten 33

2.2.4 Immunfluoreszenz-Oberflächenmarkierung und intrazelluläre Zytokinfärbung von Lymphozyten zur Zellanalyse mittels FACS 34

2.2.5 Chemotaxis-Assay 35

2.2.6 Isolierung von RNA 38

2.2.7 Reverse Transkription (RT) von mRNA in cDNA 38

2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) 40

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese 40

3. Ergebnisse 41

3.1 Charakterisierung der untersuchten T-Zell-Populationen 41

3.2 Untersuchungen zur Basalmigration verschiedener $CD4^+$ T-Zell-Subpopulationen 44
3.3 Th1- und Th2-Zellen zeigen eine unterschiedliche Migration gegenüber einigen, aber nicht allen getesteten Chemokinen..... 49
3.3.1 Selektive Chemotaxis von Th1-Zellen durch MIP-1α, MIP-1β und RANTES 49
3.3.2 Th1- und Th2-Zellen migrieren gegenüber JE/MCP-1, zeigen jedoch kaum Chemotaxis auf andere CC-Chemokine wie Eotaxin oder TARC 56
3.3.3 SDF-1 zeigt die stärkste chemotaktische Aktivität für beide Subpopulationen unter allen getesteten Chemokinen..... 59
3.3.4 CRG-2/IP-10 und MIG zeigen eine geringe Aktivität auf Th1- aber nicht auf Th2-Zellen, während KC und humanes IL-8 keine chemotaktische Migration von Th1/Th2-Zellen induzieren 60
3.4 Untersuchungen zur Chemokinrezeptor-Expression von Th1- und Th2-Zellen . 62
4. Diskussion.....68
5. Zusammenfassung.....83
6. Literatur.....85

Verzeichnis der Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
BCA-1	B cell-acivating chemokine-1
BLC	B lymphocyte chemoattractant
CD	cluster of differentiation
DC-CK1	dendritic cell chemokine 1
EDTA	Ethylen-diamino-tetraessigsäure
FACS	„fluorescense-activated cell sorter“
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEV	„high endothelial venules“
ICAM-1	intracellular cell adhesion molecule-1
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP-10	IFN-inducible protein-10
LARC	liver- and activation-related chemokine
LFA-1	lymphocyte function-associated molecule-1
MadCAM-1	mucosal cell adehesion molecule-1
MCP-1	macrophage chemotactic protein-1
MIG	monokine induced by IFNγ
MIP-1α,β	macrophage inflammatory protein-1α,β
PBS	phospatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RANTES	regulated upon activation, normal Tcell expressed and secreted
SCID	severe combined immunodeficiency
SDF-1	stromal cell derived factor-1

SLC	secondary lymphoid organ chemokine
TARC	thymus- and activation-regulated chemokine
TECK	thymus-expressed chemokine
Th	T-Helferzelle
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA	very late antigen

1. Einleitung

1.1 Th1- und Th2-Zellen als polarisierte Effektorzellen der Immunantwort

An das Immunsystem werden angesichts der ständigen Auseinandersetzung des Organismus mit pathogenen Keimen hohe Anforderungen gestellt. Mit einer großen aber endlichen Anzahl an spezifischen Antigen-Rezeptor-tragenden Zellen muss es die Fähigkeit besitzen, auf fremde Antigene zu reagieren, wo immer im Körper diese auch auftreten. Es muss das Zusammenspiel unterschiedlicher Zellpopulationen wie B- und T-Zellen, Antigen-präsentierende und akzessorische Zellen orchestrieren und gleichzeitig nur spezielle Zellen für die jeweilige Immunantwort zulassen.

In den letzten Jahren ist deutlich geworden, daß die Differenzierung von T-Lymphozyten des Helferzelltyps, die allesamt das Oberfächenmolekül CD4 exprimieren, in Subpopulationen mit definierten Mustern sekretierter Zytokine von herausragender Bedeutung für das Verständnis immunologischer Reaktionen in entzündlichen, allergischen oder auch Tumor-Erkrankungen ist (Abbas et al., 1996).

Wie Mosmann Mitte der achtziger Jahre zeigen konnte (Mosmann et al., 1986; Mosmann und Sad, 1996) und später vielfach bestätigt wurde, können naive $CD4^+$ T-Zellen unter dem Einfluß von Zytokinen zu Effektorzellen differenzieren, die durch die Produktion von Zytokinen charakterisiert sind: Th1-Zellen produzieren IFNγ und IL-2 unter dem Einfluß von IL-12 und IFNγ, während Th2-Zellen überwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 unter dem hauptsächlichen Einfluß von IL-4 produzieren.

Die unterschiedliche Rolle dieser beiden Zelltypen, die sich schon aus der Funktion der produzierten Zytokine ergibt, konnte inzwischen in vielen Krankheitsmodellen und Infektionen nachgewiesen werden. Wegweisend war hier das Modell der Leishmania major-Infektion. Bei Mausstämmen, welche bevorzugt eine Th1-dominierte Immunabwehr zeigen, führte die Infektion zur Eliminierung des Parasiten, während Mäuse mit einer Th2-dominierten Immunantwort nicht in der Lage waren, das Fortschreiten der Infektion zu verhindern und schließlich verstarben. Daneben sind auch viele andere Infektionen, insbesondere durch intrazelluläre Bakterien oder Parasiten, auf eine Th1-dominierte Immunabwehr angewiesen. Andererseits spielen diese „proinflammatorischen“ Th1-Zellen

eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. rheumatoider Athritis oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Th2-Zellen hingegen wird, neben ihrer Rolle in allergischen Reaktionen und Antikörperproduktion, eine lokal protektive oder immunsuppressive Rolle als Regulatorzelle zugeschrieben. Diese Balance zwischen notwendiger Entzündungsreaktion und überschießender Immunreaktion ist somit maßgeblich von proinflammatorischen oder protektiven Einflüssen der Pole „Th1“ und „Th2“ bestimmt.

Th1- und Th2-Zellen sind sich abgesehen von ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion phänotypisch sehr ähnlich, und es hat sich bisher als schwierig erwiesen, andere selektive Eigenschaften, z.B. die Zellen charakterisierende Membranrezeptoren zu finden. So ist bisher noch wenig darüber bekannt, welche weiteren selektiven Eigenschaften sich in der Differenzierung von T-Helfer-Subpopulationen herausbilden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen und zum Teil gegensätzlichen Funktionen in der Immunantwort ist es erforderlich, daß die jeweils benötigte Population im Gewebe präsent ist. Neben der Differenzierung und Proliferation unter dem Einfluß von Zytokinen vor Ort besteht die Hypothese, daß die spezifischen Immunzellen auch distinkte Mechanismen der Migration besitzen, die eine selektive Rezirkulation im Organismus und Migration im Gewebe, z.B. an den Ort einer Entzündung ermöglichen. Diese Prozesse werden durch Adhäsionsmoleküle sowie Chemokine und ihre Rezeptoren vermittelt, die weiter unten noch ausführlich beschrieben werden.

Erste Hinweise für diese These lieferten Versuche, in denen ein unterschiedliches Migrationsverhalten von Th1- und Th2-Zellen beobachtet werden konnte. So konnte *in vivo* die unterschiedliche Einwanderung von *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen in die entzündete Haut auf die unterschiedliche Expression von Liganden auf E- und P-Selektin zurückgeführt werden (Austrup et al., 1997). Zusätzlich gibt es zunehmende Evidenz dafür, daß Chemokine und Chemokinrezeptoren eine dominante Rolle in der Regulation des komplexen Netzwerk von Migration, Aktivierung, Differenzierung und Zell-Zell-Interaktionen in der Immunreaktion inne haben (Syrbe et al., 1999; Sallusto et al., 2000).

Die molekularen Mechanismen der Zellmigration sollen im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.2 Das Multi-Step-Modell: Homing von Lymphozyten als aktiver sequentieller Prozess

Die ständige Überwachung des Organismus und das Aufspüren von fremden Antigenen wird durch die Rezirkulation und das sogenannte „Homing“ von Lymphozyten gewährleistet. Das Homing von Lymphozyten beschreibt den präzise regulierten Prozess des selektiven Einwanderns von Lymphozyten-Subpopulationen in die verschiedenen Kompartimente des Organismus, eine Voraussetzung für die effektive Antigenerkennung und eine adaptive Immunabwehr. Am Beispiel der T-Lymphozyten zeigt sich die Bedeutung der selektiven Migration. Zunächst gelangen Vorläuferzellen der T-Lymphozyten vom Knochenmark in den Thymus, den Ort der Negativ- und Positiv-Selektion. Während daraufhin naive T-Zellen durch lymphoide Organe wie Lymphknoten und Milz rezirkulieren, wandern bevorzugt Effektor- und Memoryzellen „auf der Suche nach Antigenen“ in entzündliches Gewebe ein. Der Prozess, durch den die Zellen aus dem Blut durch das Endothel in das umliegende Gewebe gelangen, konnte in den letzten Jahren auf molekularer Ebene mehr und mehr aufgeklärt werden und wird als sogenanntes Multi-Step-Modell bezeichnet (Butcher, 1991; Springer, 1994; Butcher und Picker, 1996). Nachdem dieses zunächst für Neutrophile beschrieben wurde und später in ähnlicher Weise für Lymphozyten bestätigt wurde, scheint ein einheitliches molekulares Grundmuster zugrunde zu liegen.

Dieser im folgenden auch als Extravasation bezeichnete Vorgang des Austritts von Blutzellen aus dem Blutstrom ist ein aktiver sequentieller Prozess, der mehrere Schritte umfasst. Abbildung 1 zeigt das aktuelle Modell der Extravasation in vier Schritten:

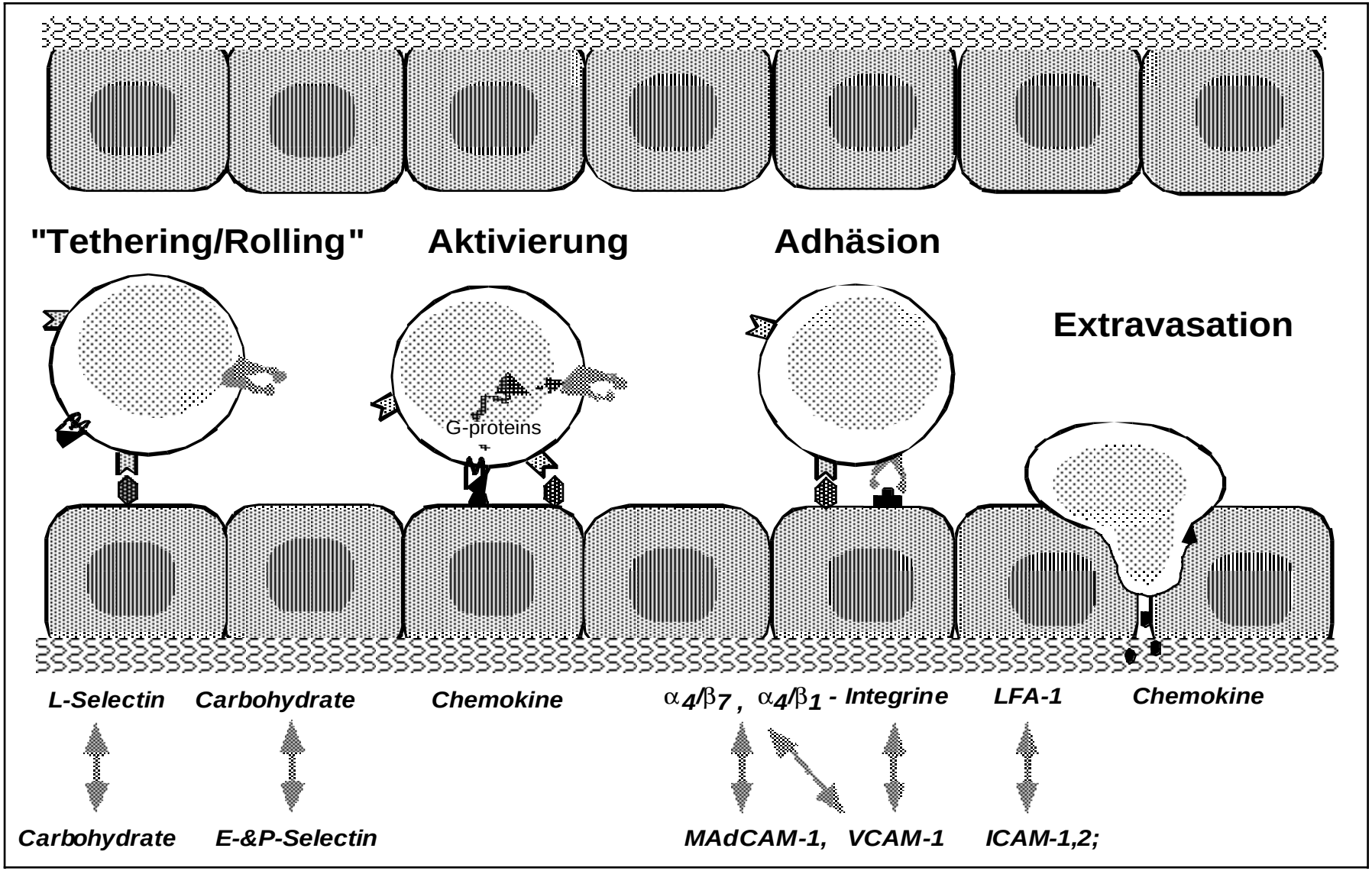


Abbildung 1. Das Multi-Step-Modell. Die einzelnen Schritte für den Austritt der Lymphozyten aus dem Blutgefäß und die sie vermittelnden Adhäsionsmoleküle sind gezeigt. Sie werden im nachfolgenden Text erläutert.

1. Im ersten Schritt kommt es durch Interaktion von leukozytären Rezeptoren mit ihren vaskulären Liganden zur primären Adhäsion. Die unter dem Einfluß von Scherkräften instabile Verbindung ist transient und reversibel, und ermöglicht das sogenannte „rolling“: die Zellen rollen verlangsamt auf dem Endothel (Bevilacqua, 1993). Dieser erste Kontakt ist hauptsächlich Selektin-vermittelt, deren Liganden aus Glykostrukturen bestehen, kann jedoch neueren Untersuchungen zufolge auch von aktivierten Integrinen übernommen werden (Jones et al., 1994; Berlin et al., 1995).

2. Die verlangsamte Wanderung des Leukozyten entlang dem Endothel erlaubt nun die Interaktion weiterer Rezeptoren. Für eine feste Bindung an das Endothel ist eine Aktivierung des Leukozyten („Adhäsions-Triggering“) notwendig. Es konnte neben Neutrophilen inzwischen auch für Lymphozyten gezeigt werden, daß Chemokine diesen zweiten Schritt, die Aktivierung von Integrinen, ermöglichen (Campbell et al., 1998). Chemokine werden entweder vom Endothel sezerniert und/oder auf ihrer Oberfläche präsentiert. Dadurch ist eine Interaktion von Chemokinen und ihren Rezeptoren auf den Leukozyten möglich (Tanaka et al., 1993). Durch eine bisher ungeklärte Signalkaskade kommt es zur G-Protein-vermittelten funktionellen Aktivierung von Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Integrine. Die Aktivierung führt zur Präsentation neuer Epitope durch eine Konformationsänderung der Integrine, oder, wahrscheinlicher, durch ein Rearrangement der Rezeptoren in der Membran, was zu einer Erhöhung der Avidität führt. In Versuchen mit Antikörpern gegen ein Epitop auf aktivierten Integrinen konnte gezeigt werden, daß nur aktivierte Integrine die Bindung vermitteln. Entsprechend sind Immunoblasten, welche voraktivierte Integrine exprimieren, in der Lage, ohne Aktivierungssignale an der Gefäßwand zu haften (Butcher und Picker, 1996).

3. Im dritten Schritt kommt es durch die Interaktion von aktivierten Integrinen mit ihren entsprechenden Liganden auf dem Endothel zu einer festen Bindung. Diese Bindung ist aktivierungsabhängig und stabil. Die Expression verschiedener Integrine auf Zellsubpopulationen stellt eine weitere Ebene dar, auf der die Selektivität der Rezirkulation reguliert werden kann.

4. Im letzten Schritt kommt es dann zur Diapedese, d.h. der Durchwanderung des Leukozyten durch das Endothel, z.B. in B- oder T-Zell-spezifisches „Microenvironment“ in lymphatischem Gewebe oder in entzündliches Gewebe. Die Wanderung des Leukozyten

durch Chemotaxis oder Haptotaxis wird vermutlich auch durch Chemokine und andere chemoattraktive Moleküle wie z.B. den Komplementfaktor C5a ermöglicht.

Ich möchte nun kurz die Gruppe der Selektine und Integrine vorstellen, die für die Schritte 1 und 3 eine wichtige Rolle spielen und dann ausführlicher auf die Chemokine eingehen, mit denen ich mich beschäftigt habe.

1.3 Selektine und ihre Liganden

Der erste Schritt der Leukozyten-Emigration wird maßgeblich durch Selektine und ihre Liganden vermittelt. Sie vermitteln die erste lose Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel („tethering“) und das Rollen von Leukozyten im Fluß („rolling“). Diese Anbindung der rollenden Zellen an das Endothel geschieht innerhalb von Millisekunden, eine Eigenschaft, die keiner anderen Gruppe von Adhäsionsmolekülen zu eigen ist.

Selektine sind Transmembran-Glykoproteine mit einer Lektin-Domäne, die eine $Ca2^{+}$-abhängige Bindung an spezifische Kohlenhydratgruppen ermöglicht (Lasky et al., 1989). Die Familie der Selektine umfaßt derzeit drei Mitglieder: L-Selektin, E-Selektin und P-Selektin. L-Selektin wird auf ruhenden Leukozyten (Lewinsohn et al., 1987), einheitlich auf naiven T-Lymphozyten und auf Subpopulationen von aktivierten und memory T-Lymphozyten exprimiert. L-Selektin ist als Homing-Rezeptor für die Leukozyten-Emigration in Lymphknoten beschrieben worden, welche in den postkapillären Venulen („high endothelial venules“, HEV) vonstatten geht (Gallatin et al., 1983).

E-Selektin wird ausschließlich auf Endothel exprimiert, in der Regel erst nach Einwirkung inflammatorischer Stimuli, wie z.B. IL-1 oder TNFα (Bevilacqua, 1993). Dementsprechend besteht seine Hauptrolle in der Rekrutierung von Leukozyten in entzündliches Gewebe.

P-Selektin ist in Weibel-Palade-Körperchen des Endothels und in Thrombozyten gespeichert (McEver et al., 1989) und wird durch Stimuli wie Histamin in Minuten an die Zelloberfläche gebracht. Vor allem Granulozyten exprimieren Liganden für P-Selektin, z.B. PSGL-1 und können daher in entzündlichen Reaktionen rasch rekrutiert werden.

Liganden für Selektine sind Oligosaccharidepitope, welche noch nicht komplett identifiziert sind, jedoch mit der Sialyl-Lewis^{x}- Gruppe verwandt sind und Neuraminsäure, Fucose,

Galaktose und Sulfat als wichtige Komponenten enthalten. So bindet L-Selektin an Kohlenhydratgruppen auf den Trägerproteinen CD34 und Glycam-1, während für P-Selektin v.a. ein Mucin-ähnliches Protein, das PSGL-1, als Ligand fungiert (Sako et al., 1993).

1.4 Integrine und ihre Liganden

Integrine vermitteln die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel und kennzeichnen deshalb den dritten Schritt des Multi-Step-Modells. Sie stellen eine große Familie von Molekülen dar, die sowohl eine Adhäsion von Zellen untereinander, als auch von Zell-Substrat Interaktionen, etwa mit extrazellulärer Matrix, vermitteln können.

Integrine sind transmembrane Glykoproteine, die aus je einer α- und β-Kette aufgebaut sind, welche nicht-kovalent gebunden sind. Sowohl von der generell hochkonservierten β-Kette, als auch von der α-Kette existieren zahlreiche Untereinheiten, die miteinander assoziiert sein können. Vielen Integrinen ist gemeinsam, daß sie für die spezifische Bindung an ihre Liganden erst aktiviert werden müssen. Eine derartige Aktivierung kann z.B. durch Chemokin-Signale erfolgen und beruht vermutlich auf einer Reorganisation der Moleküle in multivalenten Rezeptorkomplexen durch Interaktion mit dem Zytoskelett (Dustin, 1998). Dies gilt auch für die auf Leukozyten exprimierten Integrine, die β2 und α4 Integrine.

Von besonderer Bedeutung für die Migration und Rezirkulation von Lymphozyten sind:

αLβ2 (LFA-1) auf allen Leukozyten; bindet an ICAM 1,2,3 (Fawcett et al., 1992) und ist an der Rekrutierung in entzündliches Gewebe beteiligt.

α4β7 auf Lymphozyten, Eosinophilen, Mastzellen; erkennt das v.a. in Mucosa-Regionen exprimierte MAdCAM-1 und fungiert als Homing-Rezeptor für die Mucosa (Holzmann und Weissman, 1989).

α4β1 (VLA-1) auf Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen; bindet an VCAM-1 und ist wichtig für die Rekrutierung in entzündliches Gewebe sowie die Mukosa.

Die Liganden der Integrine gehören zu der großen Gruppe der Immunglobulin-Familie. Während ICAM 1,2,3 auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden, wird VCAM-1

durch inflammatorische Stimuli auf Endothelzellen induziert. Ein weiterer Ligand, das MAdCAM-1 ist auf HEV der Peyerschen Plaques exprimiert und kann zusätzlich zur Bindung an $\alpha 4\beta 7$ aufgrund entsprechender Glykosylierung auch L-Selektin abhängiges Rollen von Leukozyten vermitteln.

Die nachfolgende Tabelle 1 soll eine Übersicht über die verschiedenen Adhäsionsmoleküle, ihre Struktur und ihre Liganden geben.

Tabelle 1a. Lymphozytäre Adhesionsmoleküle

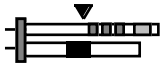
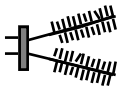
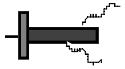
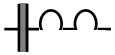
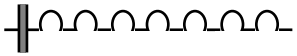
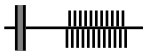
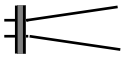
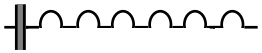
Moleküle	Andere Namen	Superfamilie	Struktur	Liganden	Rolle in
L-selectin	CD62L, LECAM-1, LAM-1,	Selektin		Kohlenhydrat (PNAd auf CD34, sgp200, GlyCAM-1 und anderen)	Lymphozyten-Rekrutierung in Lymphknoten
$\alpha_4\beta_7$	LPAM-1	β_7 Integrin		MadCAM-1, VCAM-1, Fibronektin	Lymphozytäres Homing in die Mukosa
$\alpha_4\beta_1$	CD49d/CD29, VLA-4, LPAM-2	β_1 Integrin		VCAM-1, Fibronektin (CS-1)	Lymphozyt/ECM-Interaktionen, Migration in entzündliches Gewebe
$\alpha_E\beta_7$	HML-1, $M290_{IEL}$, CD103	β_7 Integrin		E-Cadherin	Darm-IEL/intestinale Epithel-Interaktion
$\alpha_5\beta_1$	CD49e/CD29, VLA-5, FNR	β_1 Integrin		Fibronektin, L1 Zell-Adhesions-molekül	Lymphozyt/ECM-Interaktionen
$\alpha_6\beta_1$	CD49f/CD29, VLA-6	β_1 Integrin		Laminin, andere ?	Lymphozyt/ECM-Interaktionen, für T-Zell-Homing in den Thymus
LFA-1	CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$	β_2 Integrin		ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	Generelle Rolle in leukozytärer Extravasation
Mac-1	CD11b/CD18, CR3, $\alpha_M\beta_2$	β_2 Integrin		ICAM-1, Fibrinogen, C3bi, Glycane	Migration in entzündliches Gewebe
CD44	Pgp-1, H-CAM, ECMRIII	Proteoglycan-gebundene Proteine		Hyaluronat, Fibronektin, Kollagen	Lymphozyt/ECM-Interaktionen, andere ?
PSGL-1	-	Sialomucin		P-Selektin, E-Selektin	Haut- und Entzündungs - spezifische Migration von Effektor- und Memory-Zellen
ESL-1	-	unklassifiziert		E-Selektin	

Tabelle 1b. Endotheliale Adhesionsmoleküle

Molekül	Andere Namen	Superfamilie	Struktur	Liganden	Rolle in
P-selectin	CD62P, PADGEM, GMP-140	Selektin		PSGL-1, HSA	Lymphozyten/Monozyten-Rekrutierung in entzündliches Gewebe
E-selectin	CD62E, ELAM-1, INCAM-110	Selektin		Kohlenhydrat (CLA): auf ESL-1, PSGL-1	Lymphozyten/Monozyten-Rekrutierung in entzündliches Gewebe
ICAM-1	CD54	Immunoglobulin		LFA-1, MAC-1, CD43	allg. Rolle in leukozyt. Extravasation
ICAM-2	CD102	Immunoglobulin		LFA-1, $\alpha_D\beta_2$	allg. Rolle in leukozyt. Extravasation
VCAM-1	CD106	Immunoglobulin		$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$	Lymphozyten/Monozyten-Rekrutierung in entzündliches Gewebe
MadCAM-1	-	Immunoglobulin		$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, L-Selektin	Lymphozyten-Rekrutierung in die Mukosa
PNAd					
CD34	Sgp90	Sialomucin		L-Selektin	Lymphozyten-Rekrutierung in Lymphknoten
Sgp200	-	?	?	?	Lymphozyten-Rekrutierung in Lymphknoten
GlyCAM-1	Sgp50	Sialomucin		L-Selektin	Regulation der lymphozytären Migration in Lymphknoten
VAP-1	-	?		unklar	Lymphozyt/Endothelium-Interaktionen
CD31	PECAM-1	Immunoglobulin		CD31, $\alpha_V\beta_3$	Transendotheliale Migration

Komplement-bindende-Domäne

EGF-Domäne

Lectin-ähnliche-Domäne

Chicken-FGF-Rezeptor-ähnliche Region

Cystein-reiche Domäne

Metall-bindende Domäne

cleavage site

I-Domäne

Variations/Insertions-Stelle

Ig repeat

 Kohlenhydrat-Gruppen

Mucin-ähnliche Region

1.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemotaktische Stoffe sind für eine gezielte Migration von großer Bedeutung. Für Chemokine, deren erste Vertreter IL-8 und MCP-1 aus chemotaktisch wirkenden Überständen gewonnen wurden und als chemotaktische Zytokine ihren Namen erhielten, konnten inzwischen eine ganze Reihe anderer Funktionen, darunter die Überführung von leukozytären Integrinen in ihren hochaffinen Zustand beschrieben werden. Diese Funktion ermöglicht die stabile Adhäsion der Zelle an die Gefäßwand und bestimmt damit den zweiten Schritt im Rahmen des Multi-Step-Modells. Während die ersten drei Schritte dieses Modells die Anlagerung und feste Adhäsion des Leukozyten am Endothel ermöglichen, ist der vierte Schritt die Diapedese und Migration, d.h. Extravasation aus dem Gefäß und nachfolgende Wanderung der Immunzelle. Dieses sequentiellen Schritte sind Voraussetzung für Rezirkulation, Homing und Infiltration in entzündliches Gewebe. Hierbei kann die Migration von Zellen unter dem Einfluß chemotaktischer Faktoren sowohl chemotaktisch als auch haptotaktisch geschehen.

Bei der Haptotaxis migriert die Zelle entlang fest gebundener Substrate, wie z.B. extrazellulärer Matrix zum Ort der stärksten Adhäsion. Das bedeutet, daß motile Zellen in der Abwesenheit eines chemotaktischen Gradienten dazu tendieren, in Regionen mit der höchsten Liganden-Dichte zu akkumulieren. Bei der Chemotaxis bewegt sich die Zelle in die Richtung ansteigender Konzentrationen eines chemotaktischen Faktors. Dieses ist typischerweise ein lösliches Molekül, welches vom Ort seiner Produktion wegdiffundieren kann, wodurch ein Konzentrationsgradient aufgebaut wird. Allerdings kommt es im Falle der Chemokine vermutlich zu „fixierten“, d.h. immobilisierten Konzentrationsgradienten mit an Proteoglykanen der extrazellulärer Matrix gebundenen Chemokinen. Es sei hinzugefügt, daß diese beiden Mechanismen von der sogenannten Chemokinese unterschieden werden müssen. Diese beschreibt die erhöhte, ungerichtete Bewegung von Zellen, ausgelöst durch inflammatorische Mediatoren wie Histamin, IL-1 oder IFNγ (Oppenheim et al., 1991).

Während die klassischen leukozytären chemotaktischen Faktoren wie der Komplementfaktor C5a, Leukotrien B4, PAF oder N-formyl Peptide vor allem auf Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Monozyten wirken, konnte in den letzten Jahren

eine rapide wachsende Familie von chemotaktischen Zytokinen, die Chemokine, beschrieben werden. Wie oben erwähnt, sind Chemokine in der Lage, neben ihrer chemotaktischen Wirkung eine Modulation von zellulärer Adhäsion und Migration durch Beeinflussung der Affinität, bzw. Avidität von Integrinen zu bewirken.

Chemokine sind strukutrverwandte, kleine, heparin-bindende Proteine mit einer Größe von 6-30 kD (Baggiolini et al., 1997). Sie zeigen eine Homologie von 20-70% in ihrer Aminosäure-Sequenz untereinander und sind miteinander durch ein konserviertes Motiv von vier Cysteinresten, welche Disulfidbrücken ausbilden, verwandt. Die Chemokin-Superfamilie wird derzeit in vier Subfamilien unterteilt, CX_3C, CXC, CC und C, basierend auf Präsenz oder Fehlens von drei, einer oder keiner Aminosäure, welche zwischen den ersten beiden der vier Cysteine in der Nähe des N-Terminus lokalisiert sind. CXC-Chemokine können zusätzlich noch in ELR^+ und ELR^- Chemokine unterteilt werden, wobei ELR^+ Chemokine N-terminal zum ersten Cystein ein Tripeptid mit dem Motiv Glutamin-Leiucin-Arginin haben. Lymphotactin, als bisher einzigem Mitglied der C-Subfamilie, fehlt das erste und dritte Cystein des Cystein-Motivs, es hat jedoch große Ähnlichkeit in seiner Aminosäuresequenz mit CC-Chemokinen. Für Fractalkine (auch als Neurotactin beschrieben), dem einzigen $C\text{-}X_3\text{-}C$-Chemokin, konnte bisher als einzigem Chemokin sowohl eine lösliche als auch eine größere, membrangebundene Form identifiziert werden. Genomisch bestehen die meisten Chemokin-Gene aus drei Exons und zwei Introns, einige CXC-Chemokine haben ein zusätzliches Intron.

Die Familie der Chemokine, vor allem die der CC-Chemokine, ist in den letzten Jahren zu einer der größten Proteinfamilien überhaupt angewachsen und umfaßt derzeit wenigstens 40 Mitglieder. Während die ersten Chemokine aus biologisch aktiven Überständen gewonnen und identifiziert wurden, kam es mit Hilfe sogenannter „expressed sequence tags“ zu einem sprunghaften Anstieg der Beschreibung immer neuer Chemokine. Mit Hilfe dieser Technik können neue, noch unbekannte, Chemokine anhand kurzer gleichartiger Sequenzen im kodierenden Abschnitt aller Chemokine im Genom gesucht, identifiziert und anschließend vollständig sequenziert werden. Aufgrund ihrer geringen Größe sowie ihrer Ähnlichkeit untereinander waren und sind die Chemokine geradezu prädestiniert für diese Technik und sind somit wohl die erste Molekülfamilie, die in höchstem Maße vom Genomprojekt und dessen Fortschritten profitiert hat. Nach einer Zeit der rapiden Veröffentlichung immer

neuer Chemokine scheint nun ein gewisses Plateau erreicht, was die Vermutung nahelegt, daß der größte Teil dieser Molekülfamilie identifiziert wurde. Einen Überblick mit der derzeitigen Klassifikation und Nomenklatur gibt der Review von Zlotnik und Yoshie (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Auch die Zahl der Rezeptoren wächst ständig, ist jedoch deutlich kleiner als die der Chemokine. Ein Charakteristikum der Chemokinrezeptoren ist ihre Promiskuität und Redundanz. Dies bedeutet, daß ein Rezeptor mehrere Chemokine als Ligand hat, ein Chemokin aber auch an mehrere Rezeptoren bindet. Wie die Rezeptoren für C5a, fMLP, oder PAF gehören alle bisher beschriebenen Chemokinrezeptoren zur Gruppe der G-Protein gekoppelten 7-transmembranen Rezeptoren, welche charakteristische Zellantworten wie Formänderungen der Zelle, Chemotaxis, Proliferation, Degranulation oder auch die Expression von Adhäsionsmolekülen und anderen Rezeptoren initiieren können. Reguliert wird die Zellantwort durch einen Vorgang, der „Desensibilisierung“ genannt wird. Diese kann entweder homolog oder heterolog sein, was bedeutet, daß entweder der Ligand selber (homolog) oder andere (heterolog) Chemokinliganden in hoher Konzentration an dem Rezeptor einen Zustand verminderter Aktivierungsbereitschaft („state of hyporesponsiveness“) für eine bestimmte Zeit induzieren können. Es ist derzeit noch unklar, wie dieser Vorgang abläuft, denkbar wäre die Modulation oder Internalisierung des Rezeptors. Dabei scheint die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen und die Ablösung des G-Protein vom Rezeptor-Ligand-Komplex eine Rolle zu spielen. Dieses Phänomen ist möglicherweise auch für die in *in vitro* Chemotaxis-Assays zu beobachtende glockenförmige Dosis-Antwort-Kurve der Zellen auf ein Chemokin verantwortlich. Physiologisch könnte dieser Vorgang zu einem Stop der chemotaktischen Migration im Entzündungsgebiet, dem Ort höchster Konzentrationen, führen. Dabei werden andere Chemokin-induzierte Funktionen durch hohe Ligandkonzentrationen nicht verändert (Oppenheim et al., 1996). Eine ausführliche Übersicht auch im Hinblick auf die pharmakologischen Eigenschaften der Chemokin-Rezeptoren ist unter www.pharmrev.org einzusehen (Muprhy et al., 2000).

Die ständig wachsende Familie der Chemokine ist zu groß, um alle Chemokine hier angemessen besprechen zu können. Der Versuch einer Ordnung läßt sich zum einen nach strukturellen, zum anderen nach funktionellen Gesichtspunkten vornehmen. Im Gegensatz

zur strukturellen Einteilung (s.o.) wurden die Chemokine im zeitlichen Verlauf ihrer Charakterisierung nach unterschiedlichen funktionellen Kriterien eingeteilt. So wurde vor allem zu Beginn der Identifizierung dieser Molekülart eine Einteilung nach Art der reagierenden Zellen vorgenommen. Hier zeigte sich auch das bisher einzige funktionelle Korrelat zu der strukturellen Klassifizierung: ELR^+ CXC-Chemokine wirken spezifisch chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten.

Jedoch zeigte sich nach der Charakterisierung neuerer Chemokine daß diesen nicht nur die Funktion der Chemotaxis zukommt, sondern daß diese Moleküle ein vielfältiges Potential besitzen und so z. B. auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung des lymphatischen Systems spielen. So werden derzeit Chemokine auch danach eingeteilt, ob sie durch inflammatorische und immunologische Stimuli hochreguliert werden oder konstitutiv in den jeweiligen Geweben und Organen exprimiert sind. Hierbei ist interessant, daß die Gene für inflammatorische Chemokine beim Menschen in zwei großen „clusters“ auf Chromosom 4 (CXC) und 17 (CC) zu finden sind, während die konstitutiven Chemokine alleine oder in kleinen Gruppen auf mehreren Chromosomen lokalisiert sind.

In Bezug auf T-Zellen wirken erstere vornehmlich auf aktivierte und Memory-T-Zellen, während letztere auch auf naive T-Zellen, Thymozyten und Vorläuferzellen bis hin zu hämatopoetischen Stammzellen wirken. Diese Art der Einteilung orientiert sich stärker an den vielfältigen immunmodulierenden Effekten dieser faszinierenden Molekülgruppe und ist stärker an der Pathophysiologie der Immunreaktion orientiert, in der das Zusammenspiel verschiedener Immunzellen für die erfolgreiche Immunabwehr erforderlich ist.

Einen Überblick über Chemokine, ihre Rezeptoren und Zielzellen sollen die Tabelle und Abbildung 2 verschaffen.

	Chemokine	Chemokinrezeptoren	Zielzellen
	CXC-Chemokine		
ELR^+	IL-8	CXCR1, CXCR2	N, T, Ba
	GRO-α (KC)	CXCR2, CXCR1	N, Me
	GRO-β,-γ	CXCR2	N
	ENA-78 (LIX)	CXCR2	N
	GCP-2	CXCR1, CXCR2	N
	NAP-2	CXCR2	N, Ba
ELR^-	BLC/BCA-1	CXCR5	B
	IP-10	CXCR3	akt. T, NK
	MIG	CXCR3	akt. T, NK
	I-TAC	CXCR3	akt. T, NK
	SDF-1	CXCR4	T, B, Pro
	Platelet Factor 4	Unbekannt	F, E, T
	CC-Chemokine		
	MIP-1α	CCR1, CCR5	T, M, NK, Eo, Ba, Pro
	MIP-1β	CCR5	T, M, NK, Pro
	MIP-1γ/CCF 18 (nur Maus)	Unbekannt	T, Pro
	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	T, NK, Eo, Ba
	MCP-1 (JE)	CCR2	M, T, NK, Ba, Pro
	MCP-2	CCR3	M, T, NK,Eo, Ba
	MCP-3 (MARC?)	CCR1, CCR2, CCR3	M, T, NK, Eo, Ba, D
	MCP-4	CCR2, CCR3	M, T, Eo
	MCP-5 (nur Maus)	CCR2	M, T, Eo
	Eotaxin	CCR3	Eo, T
	TARC	CCR4	T
	MIP-3α/LARC/Exodus-1	CCR6	T, B
	CKb-11/MIP-3β/ELC/Exodus-3	CCR7	T, B, Thy
	MDC/STCP-1 (ABCD-1)	CCR4	T
	TECK	CCR9	Thy
	SLC/6Ckine/Exodus-2 (TCA-4)	CCR7	T, B, Thy
	I-309 (TCA-3)	CCR8	T, M
	HCC-1	CCR1	M, hP
	DC-CK1/PARC	Unbekannt	naive T, B
	C 10/MRP-1 (nur Maus)	Unbekannt	?
	MPIF-1	CCR1	
	MPIF-2/Eotaxin-2	CCR3	
	C-Chemokine		
	Lymphotactin/SCM-1α	XCR1	T, B
	SCM-1β	XCR1	
	CX3C-Chemokine		
	Fractalkine (Neurotactin)	CX3CR1	T, M

B: B-Lymphozyt, Ba: Basophiler, D: dendritische Zelle, Eo: Eosinophiler, M: Monocyt, Me: Melanomzelle, N: Neutrophiler, NK: NK-Zelle, Pro: Hämatopoet. Progenitorzelle, T: T-Lymphozyt, Thy: Thymozyt.

Tabelle 2. Chemokine und ihre Zielzellen.

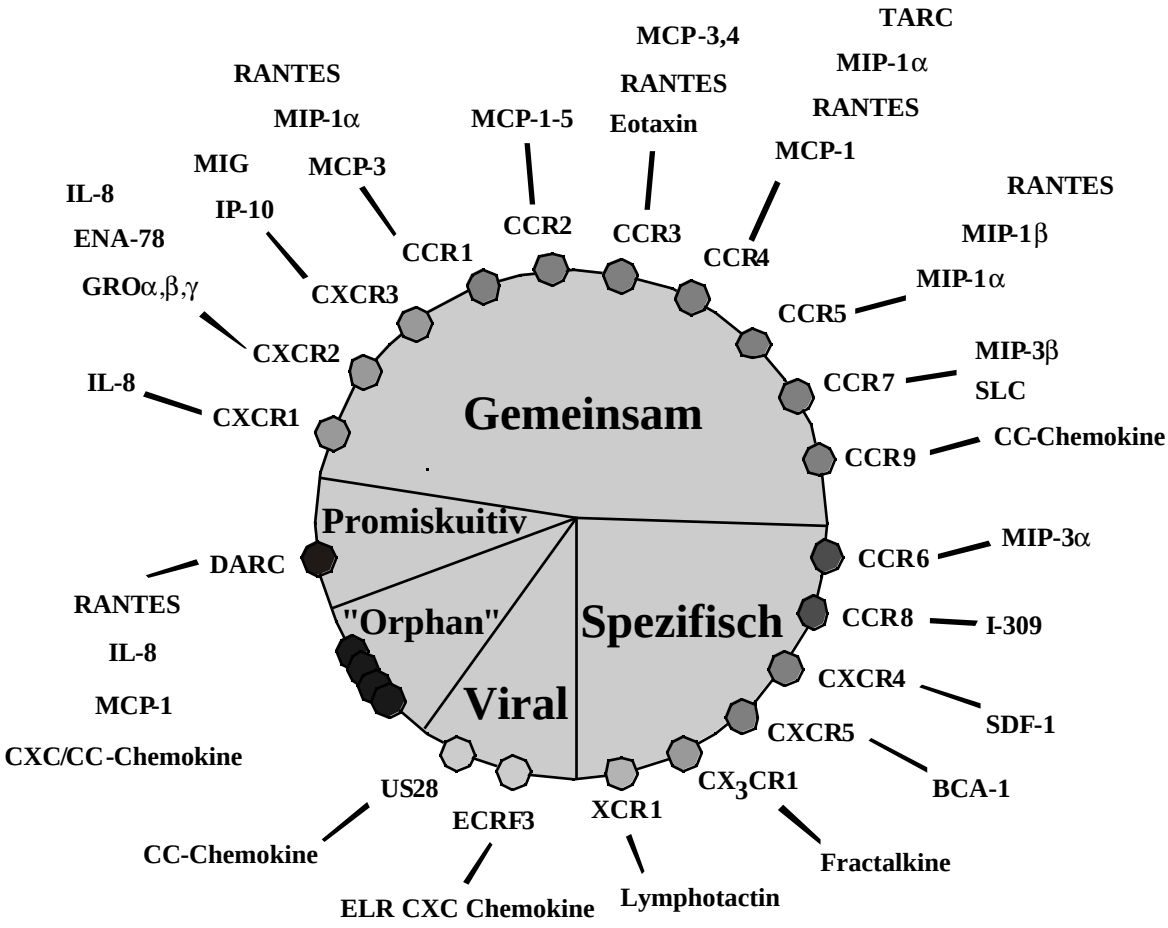


Abbildung 2. Chemokin-Rezeptoren und ihre Liganden. Gemeinsame Rezeptoren binden mehr als ein Chemokin, während spezifische Rezeptoren bisher nur einen Liganden haben. Im Gegensatz dazu bindet das sogenannte Duffy Antigen (DARC) die meisten Chemokine unabhängig von ihrer Untergruppe. Als „Orphan“-Rezeptoren werden beschriebene Rezeptoren mit z.T. sehr ähnlicher Sequenz bezeichnet, für die noch kein Ligand identifiziert wurde. Als letzte Gruppe seien Rezeptoren genannt, welche von Viren kodiert werden.

Ein charakteristisches, wenn auch inzwischen durch einige Ausnahmen gekennzeichnetes und, wie oben beschrieben, älteres Klassifikationskonzept der Chemokin-Subfamilien ist ihre Spezifität für verschiedene leukozytäre Subpopulationen. So induzieren viele CXC-Chemokine wie Interleukin-8 (IL-8), growth related peptide (GRO-α, -β), epithelial derived neutrophil attractant-78 (ENA-78) und andere CXC-Chemokine die Migration und Aktivierung von Neutrophilen, haben jedoch keinen Effekt auf Monozyten. Diese Chemokine haben die Aminosäuresequenz ELR an ihrem N-terminalen Ende und können alle einen gemeinsamen CXC-Chemokinrezeptor, CXCR-2, binden. Die humanen Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 sind IL-8 bindende Rezeptoren, wobei für CXCR-1 bisher nur IL-8 als Ligand identifiziert werden konnte. Obwohl homologe Rezeptoren bei der Maus identifiziert werden konnten, steht bis jetzt die Charakterisierung eines murinen IL-8-Homologs aus.

CXC-Chemokine, wie IFN-inducible protein-10 (IP-10) oder monokine induced by IFNγ (MIG), welche die ELR-Sequenz nicht besitzen, haben ein anderes chemotaktisches Spektrum, z.B. Wirkung auf T-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen. Erst vor kurzem konnte der spezifische Chemokinrezeptor CXCR-3 für IP-10 und MIG kloniert werden, wobei sich eine bisher nur für diesen Rezeptor beschriebene selektive Expression auf aktivierten, noch nicht polarisierten T-Lymphozyten zeigte. In neuesten Untersuchungen zur Chemokinrezeptorexpression auf Th1- und Th2-Zellen wurde beschrieben, daß CXCR-3 auf Th1- aber nicht Th2-Zellen exprimiert wird. Diese restriktive Expression läßt CXCR-3 möglicherweise als Kandidaten für die Regulation der T-Effektorzell-Rekrutierung in entzündliches Gewebe erscheinen.

Eine besondere Stellung nimmt das Chemokin stromal cell derived factor-1 (SDF-1) ein, ein ELR^--Chemokin, welches eines der bisher wirksamsten Chemokine für Lymphozyten und Monozyten, nicht jedoch Neutrophile darstellt. Sequenzanalysen zeigen, daß humanes und murines SDF-1 sich in nur einer Aminosäure unterscheiden und deuten darauf hin, daß SDF-1 strukturell von den CXC-Chemokinen genauso weit entfernt ist wie von den CC-Chemokinen. Als eines der wenigen Chemokine ist es in der Lage, chemotaktisch auf naive T-Lymphozyten zu wirken und könnte damit eine wichtige Rolle in der Rezirkulation von Immunzellen spielen. Während bei Knockout-Mäusen für fast alle der jeweils

ausgeknockten Chemokine keine signifikante Beeinträchtigung festgestellt werden konnte, sind SDF-1-defiziente Mäuse nicht lebensfähig. Neben einer stark reduzierten Anzahl an B-Zell-Progenitorzellen wiesen diese Mäuse auch einen kardialen Ventrikel-Septum-Defekt auf, was auf zusätzliche, bisher Chemokin-untypische Funktionen von SDF-1 hinweist. Der SDF-1 bindende Rezeptor, jetzt CXCR-4 genannt, war schon längere Zeit unter verschiedenen Namen wie LESTR, fusin, bzw. als „orphan receptor“ bekannt

Die CC-Chemokine stellen die bei weitem größte Familie innerhalb der Chemokine dar. Sie wirken vor allem auf Monozyten, Lymphozyten, Eosinophile und Basophile.
Bis dato sind 10 CC-Chemokinrezeptoren, CCR-1 bis CCR-10, sowie über 25 CC-Chemokine bekannt. Im Gegensatz zu den Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-4, welche trotz ausgiebiger Testung spezifisch für IL-8, bzw. SDF-1 (gilt im humanen System) sind, sind alle bisher charakterisierten CC-Chemokinrezeptoren sogenannte „shared“ Rezeptoren, d.h. sie haben mehrere Liganden. CCR-1 und CCR-2 waren die ersten CC-Chemokinrezeptoren und zunächst MIP-1α /RANTES- und MCP-1-Rezeptor betitelt. Während ersterer der Rezeptor für MIP-1α, MIP-1β, RANTES und MCP-3 ist, bindet CCR-2 die MCP-Chemokine 1-4. Diese Chemokine sind die mit am besten charakterisierten Chemokine. Während Chemokine wie das kürzlich beschriebene „dendritic cell chemokine“ (DC-CK) -1 und „liver and activation-regulated chemokine“ (LARC) präferentiell auf naive T-Lymphozyten wirken (Adema et al., 1997; Hieshima et al., 1997), sind die Zielzellen der Chemokine RANTES; MIP-1α, MIP-1β und MCP-1 T-Zellen im Effektor- und Memory-Zellstadium wobei vor allem MCP-1 auch für viele andere Leukozyten wie Monozyten und Basophile chemotaktisch ist. Für die meisten auf T-Zellen wirkenden Chemokine, v.a. für die CC-Chemokine, ist eine Wirkung auf Effektor-/Memory-T-Zellen beschrieben worden. Während die wichtige Rolle dieser Chemokine für die T-Zell-Rekrutierung in entzündliches Gewebe gut dokumentiert ist, so z.B. in der Induktion einer T-Zell-Infiltration in lymphoides und nichtlymphoides Gewebe (Murphy et al., 1996; Taub et al., 1996) und in Untersuchungen mit Hilfe des SCID-Modells, zeigen neuere Untersuchungen, daß der Einfluß von Chemokinen nicht auf inflammatorische Reaktionen beschränkt ist. Kürzlich identifizierte Chemokine wie TECK, DC-CK1, LARC,

TARC oder SLC zeigen eine starke Expression in Thymus, Lymphknoten und anderen lymphoiden Geweben und sind chemotaktisch für naive T-Lymphozyten und Thymozyten. Diese Befunde lassen eine wichtige Rolle in der Regulation des lymphozytären „Traffickings“ während der frühen Entwicklung des Immunsystems vermuten und konnte für SLC und seinen Rezeptor CCR-7 bestätigt werden. Es zeigte sich, daß Mäuse, welche entweder SLC oder CCR-7 nicht in Lymphknoten exprimieren, eine Reduktion der einwandernden naiven T-Zellen aufweisen. Analog dazu wandern B-Zellen in Mäusen ohne Expression von CXCR-5 nicht in B-Zell-Follikel der Milz (Forster et al., 1996), was die wichtige Rolle dieser Moleküle für verschiedene Immunzellen unterstreicht.
Allerdings sind viele der zugehörigen Rezeptoren noch nicht ausreichend charakterisiert, um Schlüsse auf ihre Expression auf T-Zell-Subpopulationen zuzulassen, bzw. ihre Migration in spezifische Gewebe zu zeigen.
War das Interesse an Chemokinen noch vor zwei bis drei Jahren auf ihre Rolle in der Kontrolle von Leukozyten und ihrer Migration fokusiert, so zeigt sich heute eine weitaus vielseitigere Rolle der Chemokine, z.B. in der HIV-Erkrankung, Angiogenese, Hämatopoese oder Arteriosklerose. So konnte in Versuchen mit einer CCR-2 Knock-out-Maus eine signifikant geringere Bildung arteriosklerotischer Plaques bei unveränderter Konzentration an Plasmalipiden und Lipoproteinen gezeigt werden (Boring et al., 1998). Dieses Ergebnis läßt einen kausalen Zusammenhang des Chemokinliganden MCP-1 mit der Entstehung arteriosklerotischer Plaques wahrscheinlich erscheinen.
Die möglicherweise aufregendste Bedeutung hat wohl die Entdeckung, daß HIV neben CD4 mehrere Chemokinrezeptoren für den Eintritt in die Zelle benötigt. Durch die Identifizierung dieser Rezeptoren konnten so wichtige neue Erkenntnisse für den Verlauf der Erkrankung gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, daß HI-Viren mit einem T-Tropismus CXCR-4 als Corezeptor zum Eintritt in die Zelle benötigen, während M-trope Viren CCR-5 und in geringerem Maße CCR-3 und CCR-2 benötigen (Horuk, 1999). Für das Verständnis und die Pathogenese von AIDS ist die distinkte Expression dieser Rezeptoren, CXCR-4 auf naiven Zellen und CCR-5 auf Zellen vom Effektor-/Memorytyp (Bleul et al., 1997), sowie die weitere Identifizierung von Zielzellen wie etwa Th1- und Th2-Zellen von großer Bedeutung. Die Blockierung des Viruseintritts in die Zelle könnte in Zukunft eine

herausragende Rolle in der Therapie der HIV-Erkrankung einnehmen und wird derzeit in vielen Studien untersucht (Horuk, 1999; Schwarz und Wells, 1999).

1.6 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Der Balance zwischen Th1- und Th2-Zellen kommt in immunologischen Reaktionen eine zentrale Bedeutung zu. So konnte in vielen Krankheitsmodellen eine dominante Rolle des einen oder anderen Subtyps beschrieben werden. Während bisherige Vorstellungen zu einer Balance von Th1- und Th2-Zellen von einer Proliferation und Differenzierung im Gewebe durch dort produzierte Zytokine ausgingen, suchen wir in dieser Arbeit nach möglichen neuen Wegen der Regulation. Diese Regulation könnte durch die selektive Rekrutierung dieser Subpopulationen erfolgen. Da die Extravasation von Blutzellen aus den Gefäßen in das Gewebe, beschrieben als ein Mehr-Schritt- Prozess, Voraussetzung und zentrales Element einer effektiven Immunüberwachung darstellt, ist hier die Möglichkeit einer differenzierten Regulation gegeben. Gesteuert wird diese Leukozyt-Endothel-Interaktion durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine, wobei in dieser Arbeit die Reaktionsfähigkeit von Th1/Th2-Zellen auf Chemokine untersucht werden soll. Die Vorstellung einer differenzierten Regulation an dieser Stelle wird durch die Vielzahl an Chemokinen und Rezeptoren bekräftigt. Da zudem für die phänotypisch sehr ähnlichen Zellen bis dato außer der intrazellulären Zytokinproduktion kein stabiler Marker z.B. in Form eines Membranrezeptors zur Verfügung steht, wäre die unterschiedliche Expression von Chemokinrezeptoren im Hinblick auf eine weiterführende Phänotypisierung und mögliche Therapieansätze von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit werden die Migrationseigenschaften von Th1/Th2-Zellen sowie naiven $CD4^+$ T-Zellen unter dem Einfluß von Chemokinen *in vitro* untersucht und der Rezeptorstatus dieser Zellpopulationen analysiert.

Die für diese Untersuchung wichtigen Zellpopulationen Th1 und Th2 lassen sich *ex vivo* wegen ihrer phänotypischen Ähnlichkeit nur schwer isolieren. Zusätzlich machen die mögliche Heterogenität in Bezug auf den Aktivierungszustand und Zellzyklus und die für chemotaktische Versuche benötigten Zellzahlen diese Vorgehensweise schwierig. Somit wurde als Vorgehensweise die *in vitro* Generierung von Th1- und Th2-Zellen weitgehend aus naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten gewählt. Dieser Versuchsansatz bietet die Möglichkeit, unter kontrollierten Bedingungen definierte Zellpopulationen in Bezug auf Aktivierung und Phänotyp generieren zu können. Da Unterschiede in der Wirkung einzelner Chemokine auf

naive, memory-assoziierte sowie Effektor-T-Zellen bestehen, hat diese Vorgehensweise zusätzlich den Vorteil, die jeweilige Subpopulation in unterschiedlichen Aktivierungszuständen untersuchen zu können,. Die meisten Experimente wurden mit ruhenden Effektorzellen durchgeführt, da Ergebnisse aus *in vivo* Homingversuchen eine erhöhte Migrationskapazität für diesen Zelltyp zeigen.

Im ersten Teil der Arbeit wird die intrinsische Migrationskapazität von Th1- und Th2-Zellen in unterschiedlichen Aktivierungszuständen sowie von naiven $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Hierzu wird ein Chemotaxis-Assay eingesetzt, der eine modifizierte Variante des Boyden-Chamber-Assays darstellt (Boyden, 1962). Zusätzlich wird durch Antikörper-Blockadeversuche der Einfluss von Integrinen in ihrer Interaktion mit extrazellulärer Matrix innerhalb dieses Migrationssystems untersucht. Schwerpunkt der Arbeit ist dann die Migration von Th1- und Th2-Zellen unter dem Einfluß von Chemokinen. Um mögliche Kandidaten für die selektive Regulation dieser Subpopulationen zu identifizieren werden verschiedene Chemokine auf ihre chemotaktische Aktivität auf Th1- und Th2-Zellen untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgt dann mittels molekularbiologischer Methoden eine Analyse der von Th1- und Th2-Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren. Dabei werden einige der bis zu diesem Zeitpunkt charakterisierten und auf T-Zellen exprimierten Rezeptoren untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

FACScan flow cytometer	Becton Dickinson
PCR-Gerät PTC-200	MJ Research, Inc.
Casy TT-Zellzählgerät	Schärfe System

2.1.2 Zytokine und Antikörper

Rekombinante gereinigte Chemokine und Zytokine wurden von folgenden Firmen erworben:

murines MIP-1α, MIP-1β, JE/MCP-1, Eotaxin, CRG-2/interferon-inducible protein-10 (IP-10), MIG und KC von R&D Systems (Minneapolis, MN); murines MCP-5, humanes RANTES und SDF-1 von Peprotech (Rocky Hill, NJ); IL-2, IL-4, IL-12 und IFNγ von Pharmingen (San Diego, CA). Konjugierte monoklonale Antikörper für die Oberflächenmarkierung und intrazelluläre Zytokinfärbung wurden von Pharmingen (SanDiego, CA) erworben. Murines Fibronektin wurde von Gibco erworben.

<u>unkonjugierte monoklonale Antikörper</u>

Klon 145-2C11 (Leo et al., 1987), monoklonaler Hamster Antikörper (IgG) gegen murines CD3. Die Hybridoma Linie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland) bezogen.

Klon 53-6.72 (Ledbetter und Herzenberg, 1979), monoklonaler Ratten Antikörper (IgG2a) gegen murines CD8. Die Hybridoma Linie wurde von der ATCC bezogen.

Klon PC 61 5.3 (Zubler et al., 1984), monoklonaler Ratten Antikörper (IgG1) gegen den murinen IL-2 Rezeptor. Die Hybridoma Linie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Hartmann (Marburg) zur Verfügung gestellt.

Klon 2.4G2 (Unkeless, 1979), monoklonaler Ratten Antikörper (IgG2b) gegen den murinen Fc Rezeptor II/III. Die Hybridoma Linie wurde von der ATCC bezogen.

Klon M1/70 (Springer, 1980), monoklonaler Ratten Antikörper (igG2b) gegen murines Mac-1. Die Hybridoma Linie wurde von der ATCC bezogen.

Klon 37.51 (Gross et al., 1992), monoklonaler Hamster Antikörper gegen murines CD28. Die Hybridoma Linie wurde freundlicherweise von Dr. E. Schmitt (Mainz) zur Verfügung gestellt.

polyklonale Antikörper

Kaninchen Anti-Ratten IgG (kreuzreaktiv zu Maus IgG);,bezogen von DAKO (Glostrup, Dänemark).

2.1.3 Primersequenzen

	5´ ----------> 3´
HPV	CCC AAA ATG GTT AAG GTT GCA AGC TTG
HPR	CTA GTC CTG TGG CCA TCT RCY TAG T
	(R → A oder G, Y → C oder T)
CCR1-V	GAG CCT GAA GCA GTG GAA GA
CCR1-R	AGT GGT ATA GCC ACA TGC CT
CCR3-V	GAC TGG CAG CAT TGC CTG AA
CCR3-R	TAC TCT GCT CAC AGC TGG TC
CCR4-V	ACT CGG TCA ACT CGA CGA CG
CCR4-R	GAT CCA CAG TGG ACG GCG TG
CCR5-V	TGG TCA TCT TGA GCC TGA TC
CCR5-R	CGA TCA GGA TTG TCT TGC TG

JE1-V	GAT GAT CAC CAT TAC ACC TG
JE1-R	AGC TCA CTC GAT CTG CTG TC
CXCR3-V	GTC ATG GCC TAC TGC TAT GC
CXCR3-R	AGG CTA CAG TTC CAG TCC AG
CXCR4-V	GCA GTT GAT GCC ATG GCT GA
CXCR4-R	GGA TGA AGG AGT CGA TGC TG

2.1.4 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

RPMI komplett:	500 ml RPMI 1640 (Fa. Gibco)
	2 mM L-Glutamin (Fa. Gibco)
	100 µg/ml Streptomycin (Fa. Gibco)
	100 mM Natrium-Pyruvat (Fa. Gibco)
	10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
	(FCS E 436; Fa. Linaris)
	0.02 mM Mercaptoethanol
Chemotaxis Assay Medium:	RPMI 1640
	0.5% Rinderalbumin (BSA; Fa. Gibco)
PBS/BSA/Azid:	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (PBS, Fa. Gibco)
	0.1% Rinderalbumin (BSA, Fa. Gibco)
	0.02**%** Azid (NaN_3)
Saponin-Puffer:	PBS/BSA/Azid
	0.1% Saponin (Fa. Sigma)
Dichtegradient:	17% isotonische Nycodenzlösung mit
	17 g Nycodenz
	26 ml RPMI 1640
	10 ml FCS
	ad 100 ml Aqua dest

TAE (10x)	400 mM Tris-HCl (pH 8.0)
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
DNA-Loading-Buffer (6x):	15% Ficoll (Type 400, Fa. Pharmacia)
	0.25% Bromphenolblau
	0.25% Xylen cyanol
PCR-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl (pH 8.3 bei 25°C)
	500 mM KCl
	15 mM $MgCl_2$
	0.01% (w/v) Gelatin
RT-Puffer (5x)	250 mM Tris-HCl (pH 8.3)
	375 mM KCl
	15 mM $MgCl_2$
PCR-Mix	545 µl aqua injectabile
	90 µl PCR-Puffer (10x)
	15 µl dNTP´s (10 mM)

2.2 Methoden

2.2.1 Entnahme von Lymphozyten aus peripheren und mesenterialen Lymphknoten der Maus

Zur Gewinnung von Lymphozyten wurden 6-15 Wochen alte, spezifisch-pathogenfrei-gehaltene Balb/c-Mäuse aus der Eigenzucht (Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg) wurden verwendet.

Nach Tötung der Tiere durch Genickbruch und Fixierung rückwärtig auf einem Styroporbrett wurde die Bauchhaut mit 70% Ethanol befeuchtet und die Bauchhaut entlang der Mittellinie mit sterilisiertem Besteck unter einer sterilen Werkbank aufgeschnitten. Nachdem die Bauchhaut an den Seiten fixiert wurde, konnten die bilateral oberflächlich gelegenen inguinalen, axillären, brachialen und cervicalen Lymphknoten (=periphere Lymphknoten) und die im Mesenterium des Colon ascendens kettenartig aufgereiht liegenden mesenterialen Lymphknoten entnommen werden. Nach Sammlung der Lymphknoten in RPMI-komplett und Transfer auf ein Metallsieb (Porengröße 75 µm) wurden sie mit einer Schere zerkleinert und mit einem Spritzstempel durch das Sieb in eine Petrischale mit frischem RPMI passiert. Die aus dem Gewebeverband gelösten Lymphozyten wurden resuspendiert und 10 Minuten bei 180g abzentrifugiert (= Waschschritt). Das Pellet wurde in RPMI-komplett resuspendiert.

2.2.2 T-Zell-Separation über Panning

Das Panning ist eine einfache und schnelle Methode zur Zellseparation. Man unterscheidet negatives und positives Panning, wobei bei dem auch hier verwendeten negativen Panning die gewünschte Population durch Depletion unerwünschter, Antikörper-markierter Zellpopulationen angereichert wird. Dazu werden Antikörper gegen Immunglobuline auf eine Petrischale gekoppelt, an der Antikörper-markierte Zellen und/oder Ig-exprimierende B-Zellen haften bleiben.

Wir verwendeten polyklonale anti-Ratten-Ig vom Kaninchen (Fa. DAKO, kreuzreaktiv zu Maus-Ig), die in einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS verdünnt, mindestens 12 Stunden bei 4°C auf Petrischalen inkubiert wurden. Um nicht gebundene Antikörper zu

entfernen, wurden die Petrischalen mehrmals mit PBS gewaschen. Zur Aufreinigung von ruhenden $CD4^+$ T-Zellen wurde die aus Lymphknoten gewonnene Zellsuspension mit den Antikörpern 2.4.G“ (anti-FcR II/III), 53-6.72 (anti-CD8), PC 61 5.3 (anti-IL2R), 17/227 (anti-MHC II) und M1/70 (anti-Mac-1) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde eine Konzentration von 3×10^7 Zellen/ml in RPMI-komplett eingestellt, 5 ml Zellsuspension auf eine mit Antikörper beschichtete Petrischale gegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Zellen heruntergespült, gewaschen und in RPMI-komplett resuspendiert. In einem nächsten Schritt wurde durch Dichtezentrifugation mit 17% Nycodenz eventuelle Zellreste und tote Zellen entfernt und anschließend die Zellsuspension noch zweimal gewaschen.

Die so gewonnenen $CD4^+$ T-Zellen waren >96% $CD4^+$, >99% $CD3^+$ und größtenteils (80-90%) von naivem Phänotyp (L-Selectin^{hoch}, CD45RB^{hoch}, IL-2R^{neg}).

2.2.3 *In vitro* Generation von Th1- und Th2-Lymphozyten

Da nach wie vor kein vollständig selektiver Marker für die funktionellen $CD4^+$ T-Zell-Subpopulationen Th1 und Th2 verfügbar ist, mit dem eine Aufreinigung von Th1- und Th2-Zellen *ex vivo* möglich wäre, wurde ein *in vitro* System zur Generierung von Th1- und Th2-Zellen verwendet.

Dazu wurden 6-well Platten (Fa. Nunc) mit anti-CD3 Antikörpern in einer Konzentration von 3 µg/ml PBS mindestens 12 Stunden beschichtet. Vor Verwendung wurden die Platten fünf mal mit PBS und abschließend mit RPMI-komplett gewaschen, um alle löslichen Antikörper zu entfernen. Es wurden dann aufgereinigte $CD4^+$ T-Zellen aus peripheren und mesenterialen Lymphknoten (siehe 2.2.2) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml RPMI-komplett zu 4 ml in jedes well gefüllt. Zur Generierung von Th1-Zellen wurden IL-12 (5 ng/ml), IFNγ (20 ng/ml) und anti-IL-4 (1 µg/ml), zur Generierung von Th2-Zellen IL-2 (5 ng/ml), IL-4 (10 ng/ml) und anti-IFNγ (2 µg/ml) zugegeben. Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) wurden die Zellen ohne Wechsel des Mediums auf unbeschichtete 6-well Platten transferriert und für weitere vier Tage im Brutschrank inkubiert, um die Zellen in eine Ruhephase zu überführen. Effektorzellen, die unter diesen Bedingungen generiert wurden, exprimierten L-Selektin und CD45RB vergleichbar mit

naiven Zellen, erhöhte Level an CD44 und LFA-1 und zeigten eine nur geringe IL-2R Expression (mittlere Fluoreszenz-Einheiten 4-8 im Vergleich zu 20-30 für voll aktivierte $CD4^+$ T-Zellen). Die Kontrolle der Differenzierung und des Phänotyps Th1 oder Th2 erfolgte mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (siehe 2.2.4).

2.2.4 Immunfluoreszenz-Oberflächenmarkierung und intrazelluläre Zytokinfärbung von Lymphozyten zur Zellanalyse mittels FACS

Mit Hilfe der „Flow Cytometry" lassen sich Größe („forward scatter"), Granularität („side scatter") und, nach Markierung mit fluoreszierenden konjugierten Antikörpern, Merkmale einer Zelle im Sinne von z.B. Membranrezeptoren oder intrazellulären Strukturen darstellen. So lassen sich ruhende Zellen von aktivierten Blasten als auch, durch Beladung mit unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern, unterschiedliche Zellpopulationen voneinander abgrenzen.

In meinen Experimenten war vor allem die Bestimmung der Reinheit der separierten $CD4^+$ T-Zellen, die Analyse des Aktivierungsgrades der Zellen durch den „forward scatter" und Membranproteine wie IL-2R, L-Selectin und CD69, sowie die Charakterisierung des Phänotyps, Th1/Th2 und naive oder Effektor/Memory-Zelle von Bedeutung.

Für die Oberflächenmarkierung der Zellen wurden in der Regel 1 x 10^6 Zellen in einem Volumen von 100 µl PBS + 0,5% FCS 15-20 Minuten bei 4°C mit fluoreszierenden Antikörpern inkubiert. Nach zweimaligem Waschen zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Zellen in PBS mit 1% Paraformaldehyd fixiert und entweder sofort oder bis zu einigen Tagen später analysiert.

Zur Bestimmung des Phänotyps Th1 oder Th2 wurde die Produktion von IFNγ, bzw. IL-4 der generierten Zellen gemessen. Hierfür wurde nach dem Protokoll von Assenmacher (Assenmacher et al., 1994; Austrup et al., 1997) eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Um die Expression von Zytokinen nachzuweisen, wurden die Zellen an Tag sechs re-stimuliert. Dazu wurden 1 x 10^6 Zellen/ml RPMI-komplett entweder mit 2 µg/ml anti CD-3 und anti-CD28 über Nacht oder für fünf Stunden mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin im Brutschrank aktiviert. Bei letzterer Methode wurde nach einer Stunde Restimulation zusätzlich 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma) zugegeben. Danach wurden die Zellen entweder zunächst nach obiger Methode mit Antikörpern gegen Oberflächenproteine

markiert oder sofort in PBS mit 2% Paraformaldehyd fixiert (20 Minuten Inkubationszeit bei RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden je 1 x 10^6 Zellen in 50 µl Saponin-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden im folgenden mit den entsprechenden anti-Zytokin-Antikörpern oder Kontroll-Antikörpern gleichen Isotyps für 30 Minuten bei RT inkubiert, zweimal mit Saponin-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in PBS mit 1% Paraformaldehyd fixiert.

Sämtliche Analysen wurden mit einem FACScan und FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm CellQuest durchgeführt. In allen Darstellungen wurden Debris und gestorbene Zellen durch „gating" im forward/side scatter ausgeschlossen.

2.2.5 Chemotaxis-Assay

Im Chemotaxis-Assay soll die Bewegung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten potentiell chemotaktischer Stoffe getestet werden. Dazu wurde eine modifizierte Variante der Methode nach Boyden verwendet (Abb. 3), in der obere und untere Kammer durch einen mit Poren definierter Größe versehenen Filter getrennt sind. Um diese Poren zu durchwandern bedarf es des Rearrangement des Cytoskeletts der Zellen, welches durch chemotaktische Stoffe induziert werden kann. Zusätzlich wurde der Filter mit Komponenten der extrazellulären Matrix beschichtet, um den Zellen ein Substrat in Form einer Matrix anzubieten. Dieses Substrat war in allen durchgeführten Experimenten Fibronektin.

Vor Einsatz im Assay wurden die Zellen durch Dichtezentrifugation mit 17% Nycodenz von toten Zellen getrennt und in Assay-Medium auf 5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Polyvinylpyrrolidone-freie Polycarbonat Tranwell Kultur Inserts mit einem Durchmesser von 6,5 mm und einer Porengrösse von 5 µm wurden mit 10 µg/ml Fibronektin in 50 µl Aqua dest. bedeckt und für eine Stunde im Brutschrank(37°C, 5% CO_2) inkubiert. Nach Entfernung der Fibronektin-Lösung wurden die Filter zwei Stunden im Brutschrank getrocknet. Nun wurden Chemokine in Assay-Medium oder Assay-Medium allein in einem Volumen von 600 µl in die untere Kammer gegeben. Anschliessend wurden die Filter in die wells eingesetzt und je 5 x 10^5 Th1- oder Th2-Zellen in einem Volumen von 100 µl in die obere Kammer gegeben. Die Kammern wurden für eine Stunde im Brutschrank inkubiert

und die Einsätze (= Filter + obere Kammer) danach entfernt. Die Zellen, die in die untere Kammer transmigrierten, wurden suspendiert und mit dem Casy TT Zellzählgerät (Fa. Schärfe System) gezählt. Anhand der eingesetzten Zellzahl konnte so der Prozentsatz der migrierten Zellen bestimmt werden. Alle Versuche wurden jeweils mit einem Minimum von 3 gleichen Ansätzen durchgeführt. Unterschiede zwischen Ansätzen wurden mittels *t* Test auf Signifikanz untersucht.

Für den „Checkerboard" Chemotaxis-Assay wurden Th1-Zellen entweder unbehandelt oder mit 100 ng/ml MIP-1α oder MIP-1β drei bis fünf Minuten vor Einsatz im Assay vorinkubiert und dann mit den Chemokinen in die obere Kammer gegegeben. Der restliche Ablauf entsprach dem normalen Chemotaxis-Assay.

Für die Migrationsanalyse der Zytokinproduzenten wurden *in vitro* generierte Th1- und Th2-Zellen im Verhältnis von 1:2 gemischt und im Assay auf Medium oder 10 ng/ml MIP-1α eingesetzt, wobei in den durchgeführten Experimenten jeweils dreiunddreißig Ansätze angesetzt wurden. Anschließend wurden, repräsentativ für die durchschnittliche Migration der Zellen, in je drei Ansätzen, Medium und 10 ng/ml MIP-1α, Zellzahlbestimmungen der Zellen der unteren Kammer am CASY TT durchgeführt. Die Zellen der restlichen dreißig oberen und dreißig unteren Kammern pro Ansatz wurden getrennt gesammelt, gewaschen und für fünf Stunden mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Anschließend wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung für IFNγ und IL-4 durchgeführt. So konnte die absolute Zahl an IFNγ- und IL-4-Produzenten pro Ansatz und Kammer bestimmt werden.

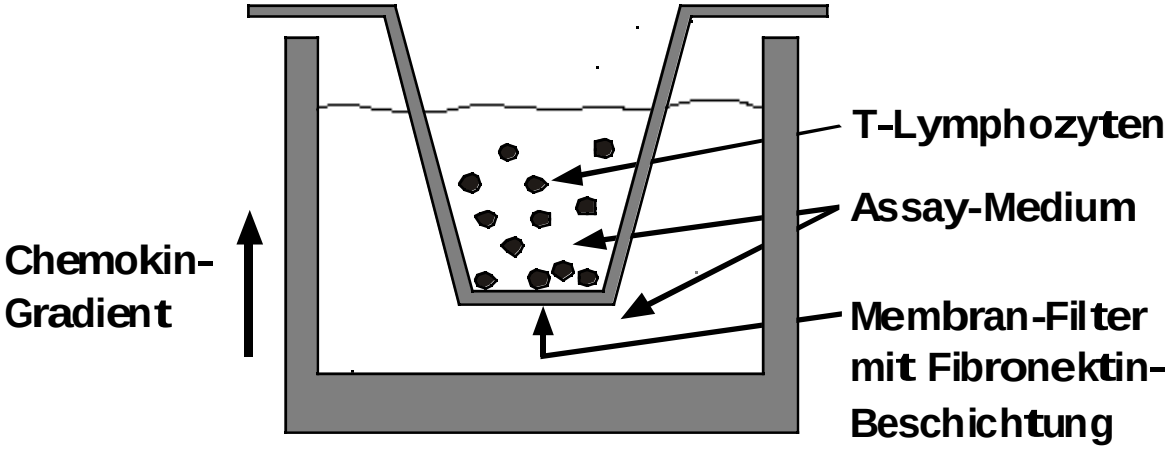


Abbildung 3. ***In vitro*** **Chemotaxis-Assay.** Das 2-Kammer-System ist durch einen Filter mit der Porengröße 5 µm in zwei Kammern unterteilt. Durch Zugabe chemotaktischer Moleküle in die untere Kammer baut sich ein Konzentrationsgradient zwischen der oberen und unteren Kammer auf. Die dort zugegeben Zellen können nur aktiv, d.h. durch Aktivierung ihres Zytoskeletts durch die Poren in die untere Kammer wandern. Nach Beendigung des Assays werden die Zellen der unteren Kammer gesammelt, gezählt und der Anteil gewanderter Zellen an eingesetzten Zellen bestimmt.

2.2.6 Isolierung von RNA

Zur Isolierung totaler RNA aus den kultivierten Th1- und Th2-Zellsuspensionen (je 1 x 10^6 Zellen/Präparation) wurde das RNeasy®-Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Hierbei wurde das zentrifugierte Zellpellet mit Guanidin-Isothiocyanat lysiert, anschließend das Lysat mittels des QIAshredder® (Fa. Qiagen) homogenisiert und unter Hinzufügen von Ethanol die komplette RNA an eine spezielle Membran gebunden. Nach mehrmaligem Waschen konnte dann die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Membran durch Zentrifugation gewonnen werden.

Für die Details der Durchführung sei auf das ausführliche Protokoll des RNeasy® Mini/Midi-Kit verwiesen.

2.2.7 Reverse Transkription (RT) von mRNA in cDNA

Zur Amplifikation von spezifischen DNA-Seqenzen aus mRNA mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) muß die zuvor gewonnene mRNA zunächst in komplementäre cDNA umgeswchrieben werden. Dieser Schritt wird durch das Enzym Reverse Transkription vermittelt.

Beim Arbeiten mit RNA muß auf äußerste Reinheit geachtet werden, da das Enzym RNase ubiquitär vorhanden ist und somit die RNA zerstören würde. Hierzu gehören Lagerung der Reagenzien auf Eis, zügiges Pipettieren, Tragen von Einmalhandschuhen, Autoklavieren der Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen und das Arbeiten in einem Bereich, der möglichst nur für RNA-Arbeiten gedacht ist.

In einem ersten Schritt wurde der gewonnenen RNA (siehe 2.2.6) DNase zugesetzt, um etwaige noch vorhandene DNA zu zerstören. Dieser Schritt ist notwendig, da die Primer aufgrund der intronlosen Struktur der hier untersuchten Chemokinrezeptoren in einem Exon liegen. Das Vorhandensein von nativer DNA könnte ansonsten in der PCR zu einem falsch positiven Ergebniss führen. Für den DNase-Verdau wurde folgendes Versuchsprotokoll eingesetzt:

RNA	1 µg
RT-Puffer (5x)	2 µl
DNase I	1 U
aqua inject.	auf 15 µl auffüllen.

Dieser Ansatz wurde nun in der PCR-Maschine inkubiert und zwar für:

30 Minuten bei 25°C	(Entfernung der DNA)
5 Minuten bei 75°C	(Abstoppen der Reaktion)

Nach Abkühlung auf 4°C wurde die RT mit folgendem Reaktionsgemisch begonnen:

RNA	0.5 µg oder 1 µg
Randeom Hexamers (200ng/ml)	3 µl
aqua inject.	auf 15 µl auffüllen

Dieser Ansatz wurde für 2 min bei 70°C inkubiert und danach auf Eis gesetzt.

RT-Puffer (5x)	6 µl
DTT (0.1M)	3.4 µl
dNTP´s (10mM)	2 µl
MMLV reverse Transkriptase	1.5 µl (300 U)
aqua inject.	auf 30 µl auffüllen

Für die RT wurde folgende Inkubation verwendet:

10 Minuten bei 24°C

40 Minuten bei 42°C

2 Minuten bei 95°C

Danach wurden die Proben mit RNase H^- vor Beginn der PCR behandelt, um eventuell störende RNA enzymatisch abzubauen. Dabei wurde jeder Probe 1 µl RNase H^- zugesetzt und dann 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bis zu Beginn der PCR auf Eis gesetzt.

2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion folgt der reversen Transkription und amplifiziert spezifische DNA-Sequenzen aus der zuvor hergestellten cDNA. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

cDNA	3 µl
PCR-Mix	18 µl
Primer 1 (50ng/µl)	2 µl
Primer 2 (50ng/µl)	2 µl
AmpliTaq Gold	0.2 µl (0.5 U)

Für diesen Ansatz wurde folgendes Programm verwendet:

9 Minuten bei 94°C,

darauf folgend ein Zyklus mit folgendem Modus:

45 Sekunden bei 94°C

45 Sekunden bei 58°C

1 Minute bei 72°C.

Die Anzahl der Reaktionszyklen variierte zwischen 31 und 40 Zyklen.

8 Minuten bei 72°C

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Trennung von RNA-Fragmenten zur Kontrolle der Qualität der eingesetzten RNA sowie für die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurden horizontale Gele aus 1.2-1.6%iger Agarose in Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer) verwendet.

Zur Färbung der Gele wurde der Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0.1 µg/ml zugesetzt. Die Fotografie der Gele erfolgte bei retrograder Beleuchtung durch einen UV-Licht-Transluminator.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der untersuchten T-Zell-Populationen

Die im weiteren als naive $CD4^+$ T-Zellen beschriebene Population entspricht den frisch präparierten, mit Hilfe des „Negativ-Panning“ separierten $CD4^+$ T-Zellen. Die Reinheit dieser T-Zellen betrug regelmäßig 96-98%. Die Zellen waren des weiteren vornehmlich L-$Selektin^{high}$ und $CD25^{negativ}$ (Abb. 4a), da aktivierte $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen den IL-2-Rezeptor (CD25) abgetrennt wurden. Allerdings befindet sich in dieser Population neben den T-Lymphozyten mit dem naiven Phänotyp L-$Selektin^{high}$, $CD25^{negativ}$ auch T-Lymphozyten des memory-assoziierten Phänotyps L-$Selektin^{low}$, $CD25^{negatib}$. Ihr Anteil liegt unter 20%, weswegen im nachfolgenden, etwas ungenau, von naiven $CD4^+$ T-Zellen gesprochen wird. Nachfolgende Abbildung zeigt die Phänotypisierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen.

Diese Zellen wurden *in vitro* zur Generierung von Th1- und Th2-Zellen unter Zugabe der jeweiligen Zytokine mit immobilisierten anti-CD3 Antikörpern stimuliert. Während der 2 Tage dauernden Stimulation zeigten die Zellen eine hohe Expression des IL-2-Rezeptors (CD25) und eine Herunterregulierung von L-Selektin (hier nicht gezeigt); nach weiterer Kultivierung (bis Tag 6) in Abwesenheit von anti-CD3 Antikörpern näherte sich die Expression dieser Marker wieder der von naiven Zellen an. Da die Zellen den Phänotyp L-$Selektin^{high}$, $CD25^{low}$ zeigen (Abb. 4b), wird hier und im weiteren von ruhenden Effektorzellen gesprochen. Dies zur Unterscheidung zu Memory-Lymphozyten, welche den Memory-assoziierten Phänotyp L-$Selektin^{low}$ und $CD25^{negativ}$ aufweisen.

An Tag 6 der Kultivierung, an dem die differenzierten, ruhenden Effektorzellen im Chemotaxis-Assay eingesetzt wurden, wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt, um die Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen zu überprüfen. Abbildung 4c zeigt die Produktion von IL-4 und IFNγ von Th1/Th2-Zellen.

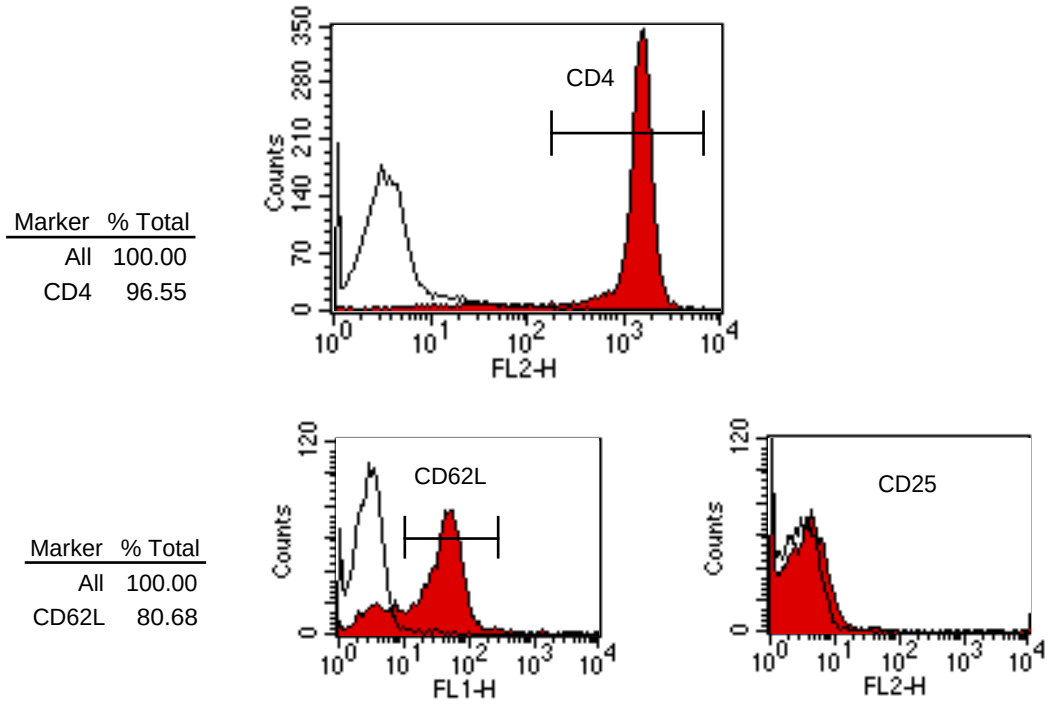


Abbildung 4a. Phänotypisierung der aufgereingten Lymphknotenzellen. Frisch präparierte Zellen aus peripheren und mesenterialen Lymphknoten zeigen den Phänotyp $CD4^{+}$, $CD25^{negativ}$ (IL-2-Rezeptor) und sind überwiegend $CD62L^{high}$ (L-Selektin).

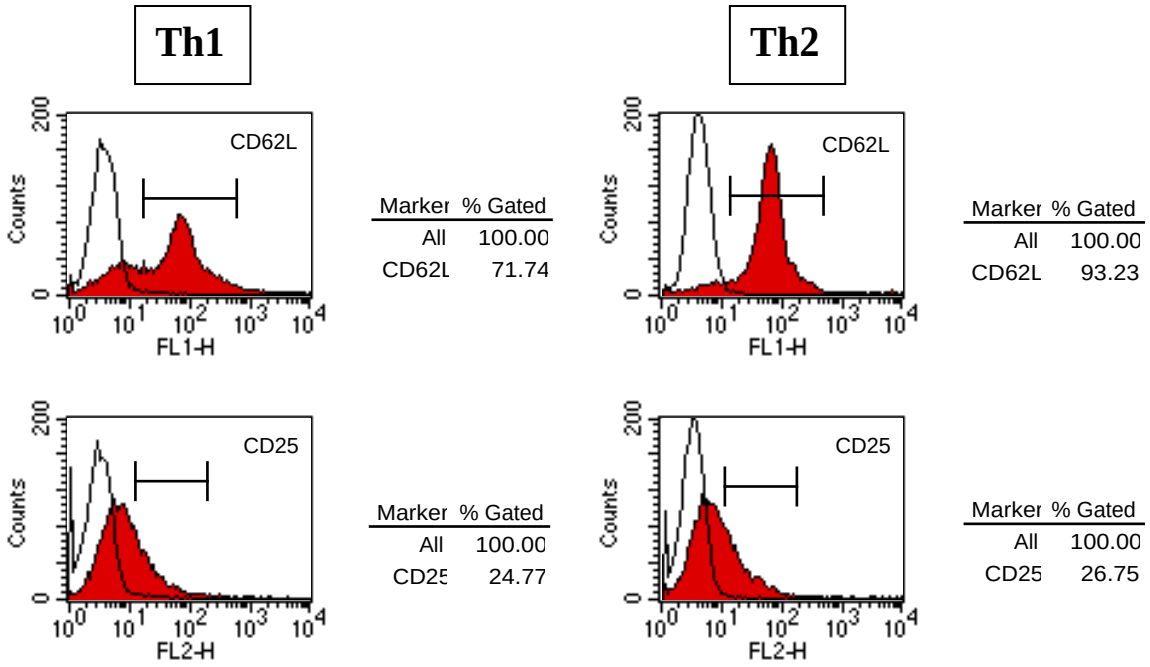
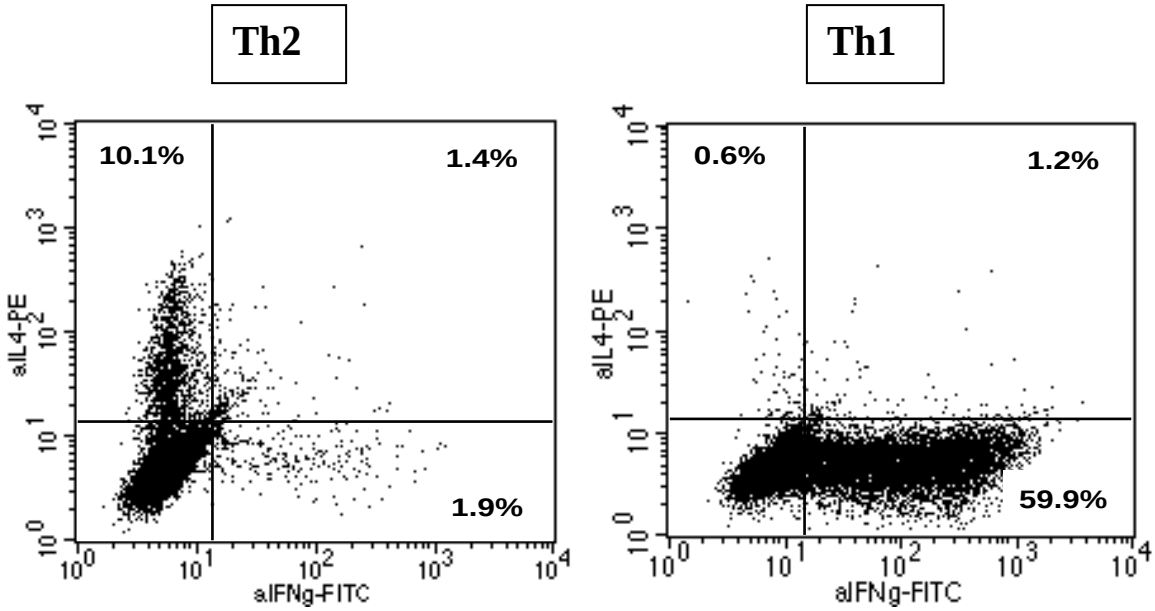


Abbildung 4b. IL-2-Rezeptor- und L-Selektin-Expression der ruhenden Effektorzellen "Th1" und "Th2". Th1- und Th2-Zellen wurden an Tag 6 der Kultivierung mit anti-CD62L-FITC (obere Reihe) und anti-CD25-PE (untere Reihe) angefärbt.



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1434	10.13	9.56
UR	199	1.41	1.33
LL	12259	86.56	81.73
LR	270	1.91	1.80

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	70	0.56	0.47
UR	151	1.22	1.01
LL	4753	38.29	31.69
LR	7440	59.93	49.60

Abbildung 4c. Zytokin-Produktion von Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen und Th2-Zellen wurden an Tag 6 der Kultivierung mit PMA/Ionomycin re-stimuliert und mit anti-IL4-PE und anti-IFNγ-FITC intrazellulär angefärbt.

3.2 Untersuchungen zur Basalmigration verschiedener $CD4^+$ T-Zell-Subpopulationen

Verschiedene $CD4^+$ Zellpopulationen wurden im Chemotaxis-Assay untersucht. Dabei zeigte sich eine überraschend hohe intrinsische migratorische Aktivität von ruhenden T-Effektorzellen gegenüber naiven $CD4^+$ T-Zellen. Während die Migration von frisch isolierten $CD4^+$ T-Zellen nach 1 h durch Fibronektin-beschichtete Filter unter 3% der eingesetzten Zellen lag, migrierten 5.3 ± 2.3% Th1- und 7.9 ± 2.6% Th2-Zellen (Abb. 5). Wurde der Assay auf 4 h verlängert, resultierte dies in einer kontinuierlichen Zunahme der Migration der Effektorzellen, die bis zu 35% betrug. Interessanterweise zeigte sich keine signifikante Vermehrung bei den frisch präparierten $CD4^+$ T-Zellen.

Die Unterschiede zwischen der frischen, hauptsächlich aus naiven $CD4^+$ T-Zellen bestehenden Zellpopulation und der Effektorzellpopulation war nicht durch ein unterschiedliches Aktivierungsstadium zu erklären, da die niedrige IL-2R- und hohe L-Selektin-Expression ein Charakteristikum beider Populationen war.

Desweiteren zeigten aktivierte Effektorzellen eine niedrigere Migrationsrate als ruhende Effektorzellen. In diesem Experiment, in dem die zwei Tage aktivierten und danach vier Tage kultivierten Th1/Th2-Zellen mit nur zwei Tage aktivierten Th1/Th2-Zellen verglichen wurden, zeigten alle vier Subpopulationen eine ähnliche Migrationskinetik über vier Stunden, jedoch auf unterschiedlichem Niveau. So migrierten nach einer Stunde unter 2% der aktivierten Zellen und mehr also doppelt so viele ruhende Zellen (Abb. 6). Dieses Verhältnis war auch nach vier Stunden ähnlich. Somit unterscheidet sich die Migrationskinetik von Effektorzellen von der naiver $CD4^+$ T-Zellen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß ruhende Effektorzellen in der Lage sind, aktiver durch Gewebe zu migrieren als naive Zellen oder sich noch im Aktivierungszustand befindliche Effektorzellen.

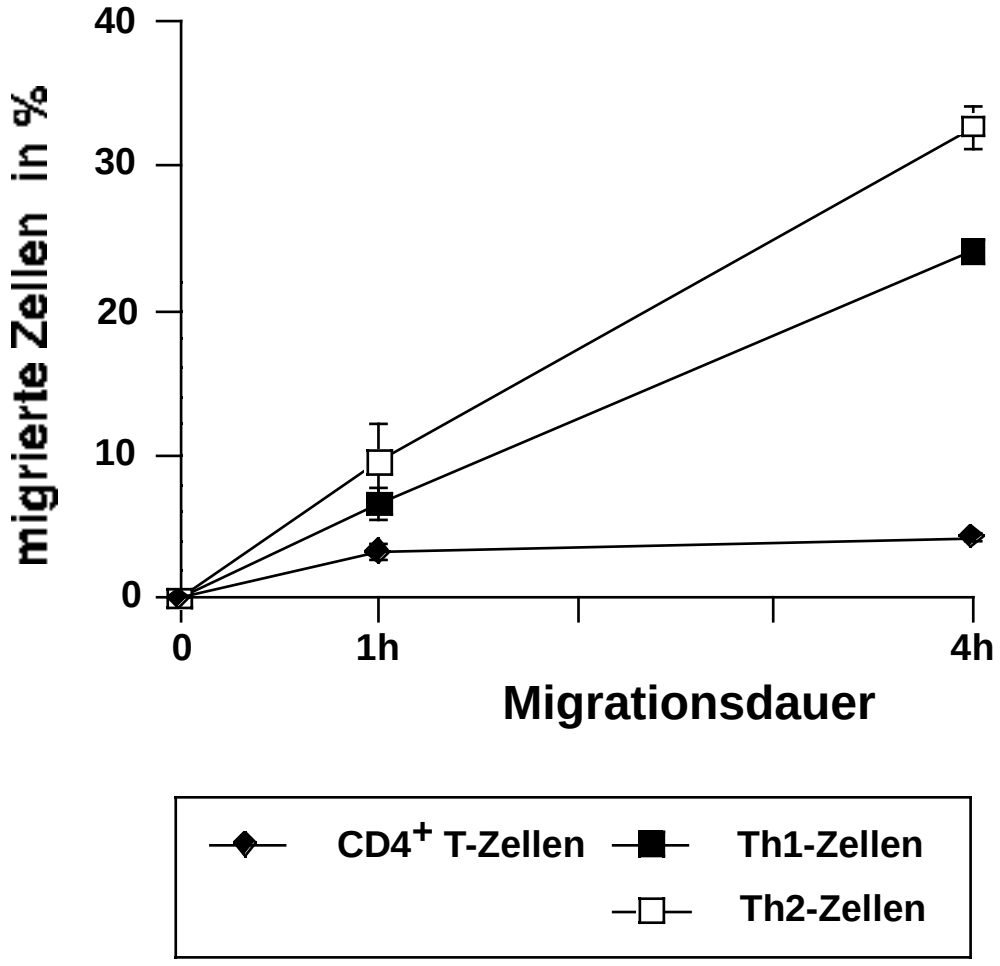


Abbildung 5. Ruhende Effektorzellen zeigen eine höhere Migrationsrate als naive CD4$^+$ T-Zellen. Ruhende Effektorzellen zeigen sowohl nach einer als auch nach vier Stunden eine deutlich höhere Migration als naive CD4$^+$ T-Zellen im Chemotaxis-Assay. Im Vergleich zu den Effektorzellen sinkt die Migrationsrate bei den naiven CD4$^+$ T-Zellen nach einer Stunde ab. Gezeigt ist ein repräsentatives von insgesamt sechs Experimenten. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen.

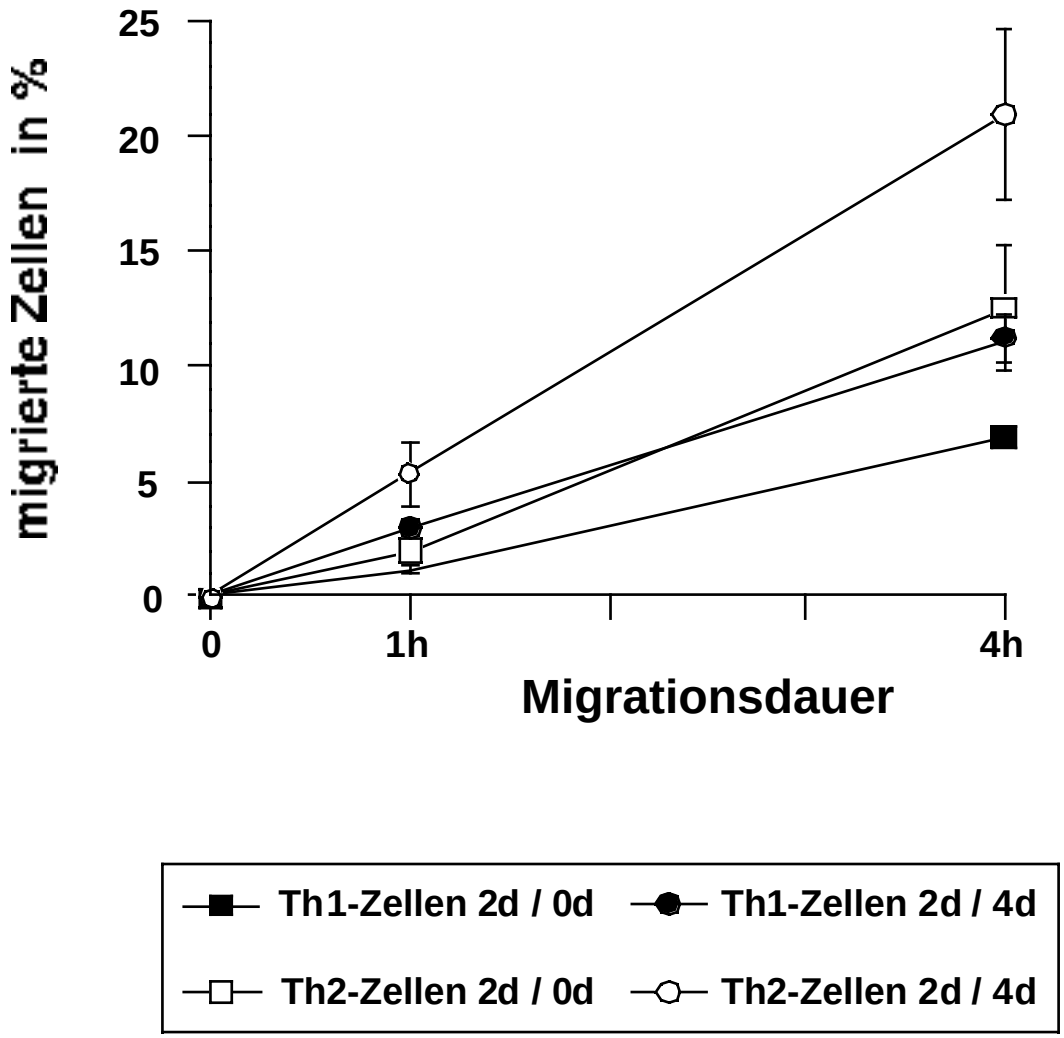


Abbildung 6. Ruhende Effektorzellen zeigen eine höhere Migrationsrate als aktivierte Effektorzellen. Ruhende Effektorzellen zeigen sowohl nach einer als auch nach vier Stunden eine höhere Migration als aktivierte Effektorzellen, wobei alle Effektorzellen eine ähnliche Migrationskinetik haben. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen.

Beim Vergleich der Spontanmigration von Th1- und Th2-Zellen zeigten sich klare Unterschiede (Abb. 6). In zehn von zwölf einstündigen Experimenten und allen vierstündigen Experimenten war die Th2 Migration höher als die der Th1-Zellen. So waren nach 1 h zwischen 1.2 und 2 mal mehr Th2- als Th1-Zellen in die untere Kammer gewandert. Dieser Unterschied war signifikant mit $p < 0.001$ (zwölf Experimente). Auch dieser Effekt ließ sich nicht durch unterschiedliche Aktivierungszustände erklären, die vergleichbar waren. Bei Experimenten mit unbeschichteten Filtern war dieser Effekt nicht signifikant. Allerdings lag in diesem Fall die basale Migration für beide Zellpopulationen unter 3% nach 1 h, so daß sich eventuelle Unterschiede möglicherweise nicht zeigten.

Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Expression von Rezeptoren für Fibronektin eine Rolle spielt, wurden einstündige Experimente unter Zugabe von monoklonalen Antikörpern gegen die Integrin α4- und α6-Kette durchgeführt. Die Integrine, welche an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Laminin oder Fibronektin binden, haben alle die β1-Kette gemein, jeweils verbunden mit einer von mehreren möglichen α-Ketten. Dabei sind z.B. Laminin und Kollagen Liganden für α-Ketten wie α1, α2 und α6, während α4 und α5 Fibronektin und VCAM-1 binden. Wie in Abbildung 7 zu sehen, konnte sowohl mit Antikörpern gegen α4- als auch α6-Ketten die Basalmigration von Th2-Zellen effizienter als die der Th1-Zellen blockiert werden. Die Kombination beider Antikörper brachte keine zusätzliche Reduktion der Blockade. Da jedoch kein Antikörper gegen die α5-Kette zur Verfügung stand, welche der Hauptligand für Fibronektin ist, sowie gegen einige andere Rezeptoren, welche Fibronektin binden können, kann nicht abschließend beurteilt werden, wie stark die unterschiedliche Migrationskapazität vom Fibronektin abhängig ist. Für zusätzliche Mechanismen spricht, daß auch in einem Migrationsversuch durch mit Endothel beschichtete Filter Th2-Zellen eine stärkere Transmigration als Th1-Zellen zeigten (J. Siveke und B. Engelhardt, nicht publiziert).

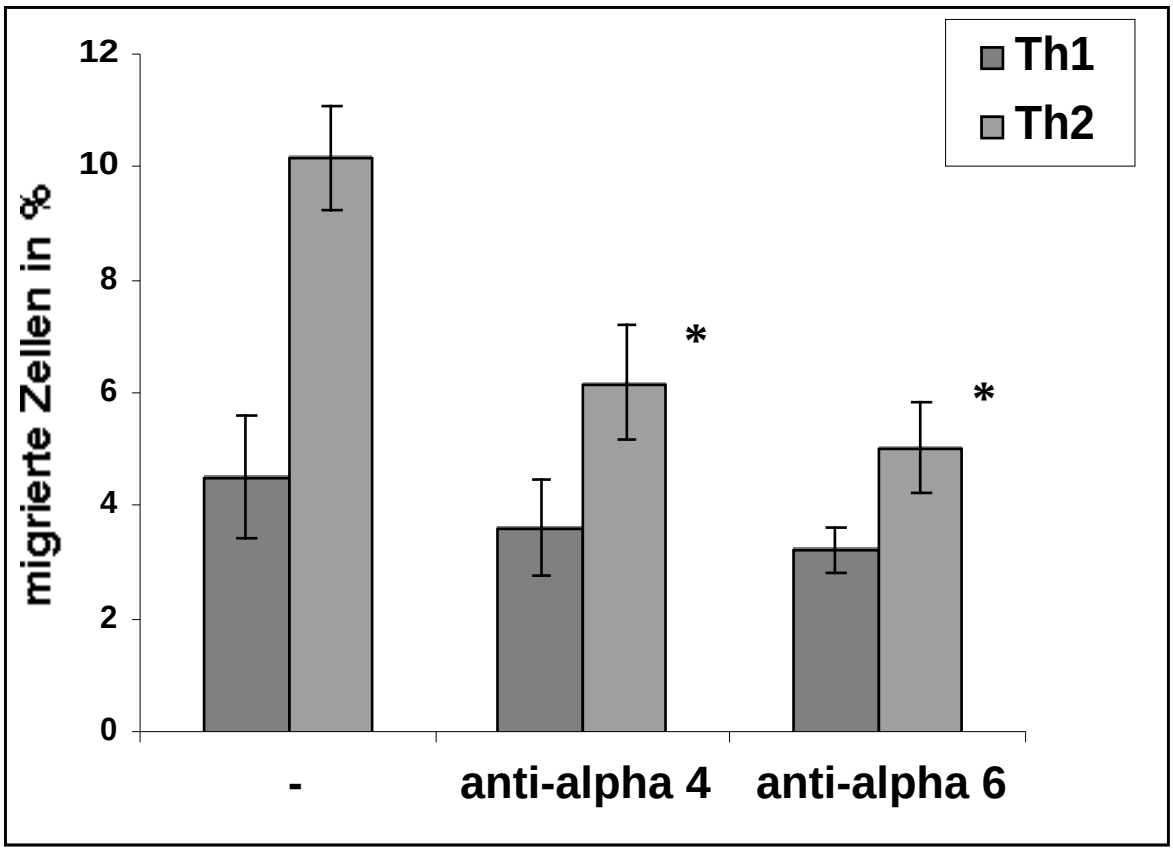


Abbildung 7. Reduktion der Spontanmigration von Th2-Zellen durch Integrin-Antikörper. Zugabe von Antikörpern gegen die Integrin- α4- oder α6-Kette reduziert die Migration von Th2-Zellen im Vergleich zur Basalmigration im Chemotaxis-Assay nach einer Stunde. Die Differenz zwischen der Migration ohne Antikörper-Zusatz und der Migration mit entweder anti- α4- oder α6 war signifikant (*) mit $p < 0.05$. Th1-Zellen zeigten keine signifikante Beeinflussung der Migration durch diese Antikörper. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von zwei Experimenten mit insgesamt 6 Einzelwerten.

3.3 Th1- und Th2-Zellen zeigen eine unterschiedliche Migration gegenüber einigen, aber nicht allen getesteten Chemokinen

3.3.1 Selektive Chemotaxis von Th1-Zellen durch MIP-1α, MIP-1β und RANTES

Unter der Annahme, daß Chemokine bei der Rekrutierung von Leukozyten und insbesondere von T-Zell-Subpopulationen eine wichtige Rolle spielen, untersuchten wir die chemotaktische Antwort von Th1- und Th2-Zellen auf verschiedene Chemokine.

MIP-1α zeigte eine effiziente chemotaktische Aktivität für Th1-Zellen. Diese Migration der Zellen war dosisabhängig und zeigte die für Chemokine typische Glockenform mit einem Maximum zwischen 1 und 10 ng/ml (Abb. 8). Optimale Konzentrationen von MIP-1α induzierten einen mehr als dreifachen Anstieg der Migration, zwischen 14-18%, verglichen mit der Spontanmigration ohne MIP-1α von 4-7% in drei Experimenten. In Kontrast dazu zeigten Th2-Zellen keine signifikant erhöhte Migration durch MIP-1α (Abb. 8). Überraschenderweise ließ sich bei hohen Konzentrationen über 100 ng/ml eine Reduktion der Migration von Th2-Zellen unter den Level der Spontanmigration feststellen. Diese Reduktion war in allen drei Experimenten signifikant mit $p < 0.002$, $p < 0.002$ und $p < 0.02$ respektive.

Diese deutlichen Unterschiede in der Migration von Th1- und Th2-Zellen waren nicht von ihrem Aktivierungsstadium abhängig. Zum einen war, wie schon oben erwähnt, die Expression von Aktivierungsmarkern zwischen beiden Populationen sehr ähnlich. Zum anderen zeigten voll aktivierte Th1/Th2-Zellen ähnliche Unterschiede, allerdings bei insgesamt niedrigerer Migrationsrate. Diese Zellen wurden zwei Tage früher als sonst im Chemotaxisassy eingesetzt und zeigten eine hohe Expression des IL-2-Rezeptors und keine Expression von L-Selektin. Auch hier lag das Maximum der MIP-1α-induzierten Chemotaxis für Th1-Zellen bei 10 ng/ml (Abb. 8). Interessant ist, daß auch in diesem Experiment die Migration von Th2-Zellen signifikant unter dem Niveau der basalen Migration lag ($p < 0.02$).

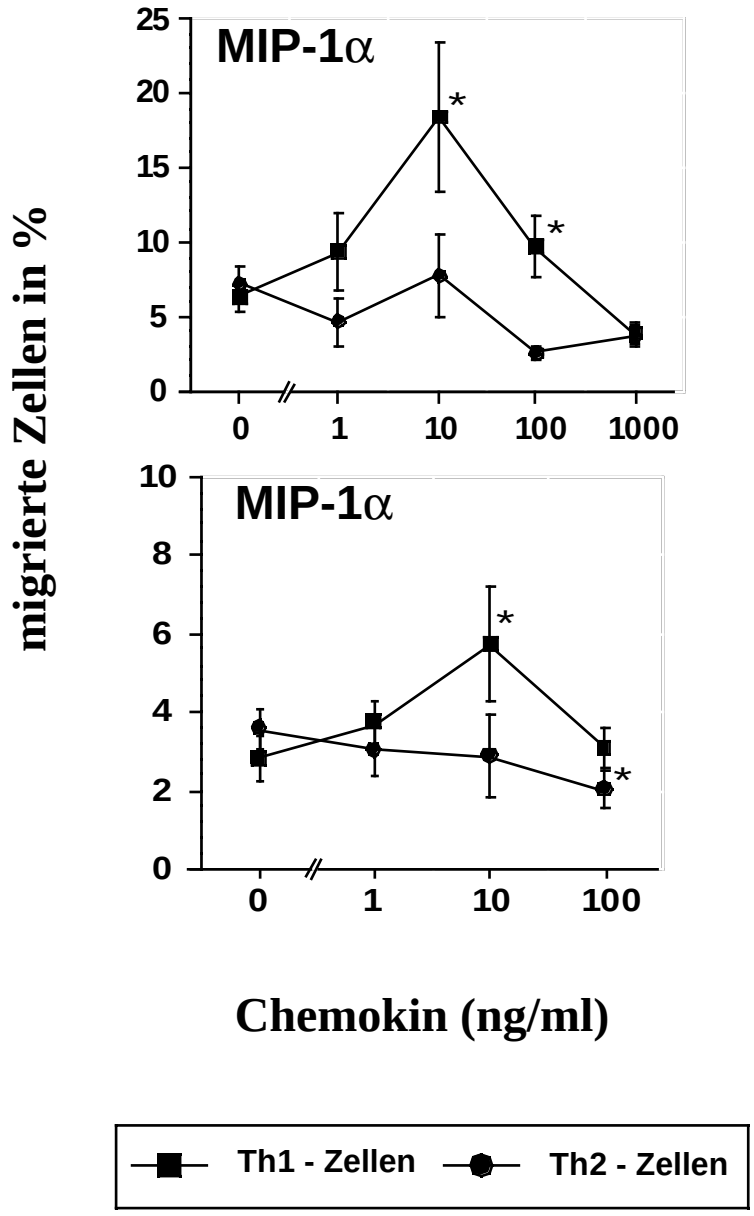


Abbildung 8. Selektive Chemotaxis von ruhenden und aktivierten Th1-Zellen durch MIP-1α. Gezeigt ist ein repräsentatives von insgesamt fünf Experimenten für ruhende Th1/Th2-Effektorzellen ($CD25^{low}$ und $Selektin^{high}$; oben) und ein mit aktivierten Th1/Th2-Zellen ($CD25^{high}$ und $Selektin^{low}$) durchgeführtes Experiment (unten). Die Differenz zwischen basaler und Chemokin-induzierter Migration (*) war signifikant mit $p < 0.05$. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen.

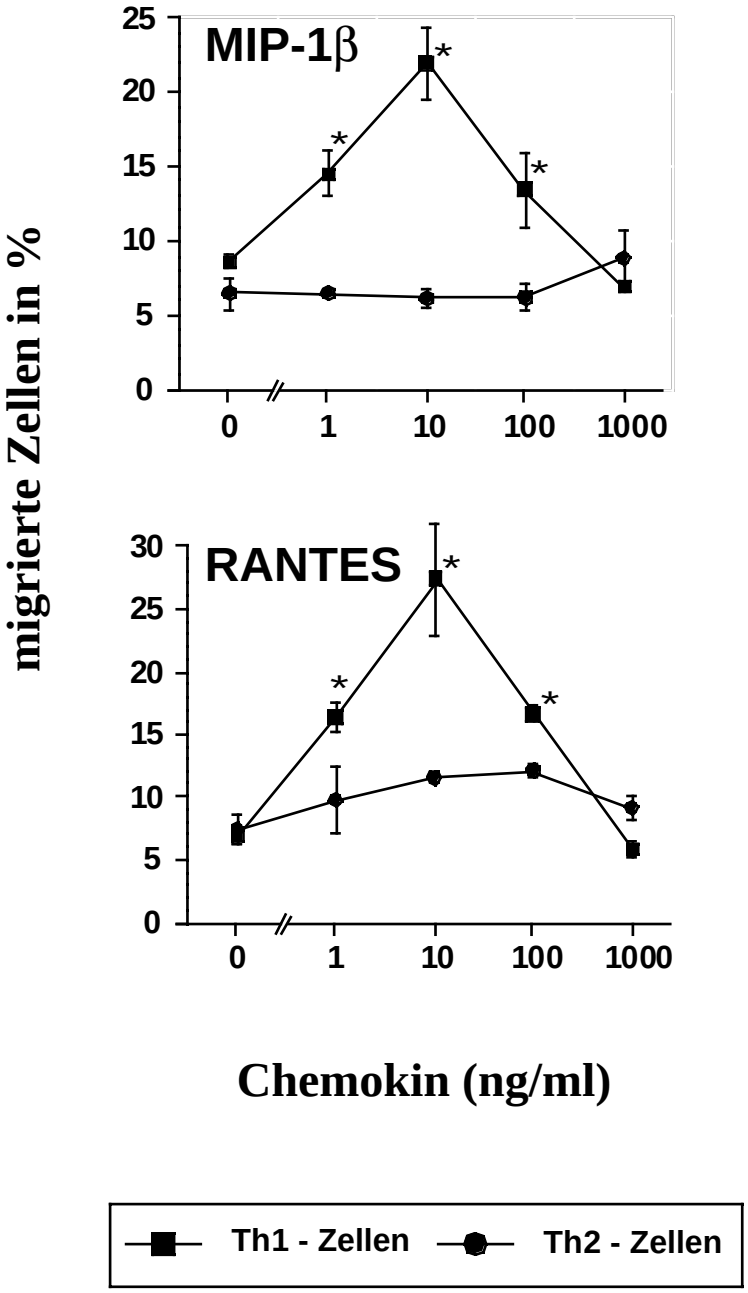


Abbildung 9. Selektive Chemotaxis von Th1-Zellen durch MIP-1β und RANTES. Die Differenz zwischen basaler und Chemokin-induzierter Migration (*) war signifikant mit $p < 0.05$. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen eines repräsentativen von mindestens 3 Experimenten.

MIP-1β hatte eine ähnliche Aktivität für Th1-Zellen wie das verwandte MIP-1α. Auch hier konnte eine dosisabhängige Chemotaxis mit einem Maximum von 10 ng/ml und signifikanter Chemotaxis zwischen 1 und 100 ng/ml beobachtet werden (Abb. 9). Vergleichbar mit MIP-1α war auch die Effizienz mit einem etwa dreifachen Anstieg der Migration gegenüber der Spontanmigration. Ein geringer Anstieg in der Migration von Th2-Zellen zeigte sich bei Konzentrationen höher als 100 ng/ml. Dieser Anstieg bei 1000 ng/ml war signifikant ($p < 0.001$ in drei Experimenten), erreichte jedoch nie das Migrationsmaximum der Th1-Zellen. Bisher identifizierter Chemokinrezeptoren, der MIP-1β als funktionellen Liganden bindet ist CCR-5. CCR-5 bindet zusätzlich MIP-1α und RANTES (Meyer et al., 1996). Da zum Zeitpunkt der Experimente kein murines RANTES zur Verfügung stand, verwendeten wir humanes RANTES, welches auch als funktioneller Ligand für den murinen CCR-5 beschrieben ist. Es zeigte sich eine zum MIP-1α und MIP-1β sehr ähnliche Wirkung für Th1-Zellen mit einem Maximum bei 10 ng/ml und nur geringer aber signifikanter Chemotaxis von Th2-Zellen bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 ng/ml (Abb. 9).

Da in Kulturen mit primären Effektorzellen nur ein Teil der Zellen zur Zytokinproduktion induziert werden kann, untersuchten wir, ob die beobachteten selektiven Chemokinantworten auch für die eigentlichen Zytokin-Produzenzen zu beobachten sind. Dazu wurde eine aus Th1- und Th2-Kulturen gemischte Population benutzt. Es wurde ein Chemotaxisassay durchgeführt, bei dem in einem Ansatz die Zellen in Medium, im anderen in Medium mit 10 ng/ml MIP-1α wanderten. Die durchgewanderten Zellen wurden gesammelt und es wurden von der Ausgangspopulation sowie den Zellen des jeweiligen Ansatzes eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. So konnte die Anzahl der IFNγ- und IL4-Produzenten vor und nach Migration in den jeweiligen Kompartimenten bestimmt werden. Wie in Abbildung 10 zu sehen, reagierten IFNγ-Produzenten chemotaktisch auf MIP-1α, IL-4-Produzenzen jedoch kaum. Während die Konzentration an gewanderten IL4-Produzenten in Medium und MIP-1α 6.9%, bzw. 8.7% betrug und somit annähernd konstant war, wanderten beim MIP-1α-Ansatz fast vier mal so viele IFNγ-Produzenten verglichen zum Medium-Ansatz (16.5% vs. 4.5%).

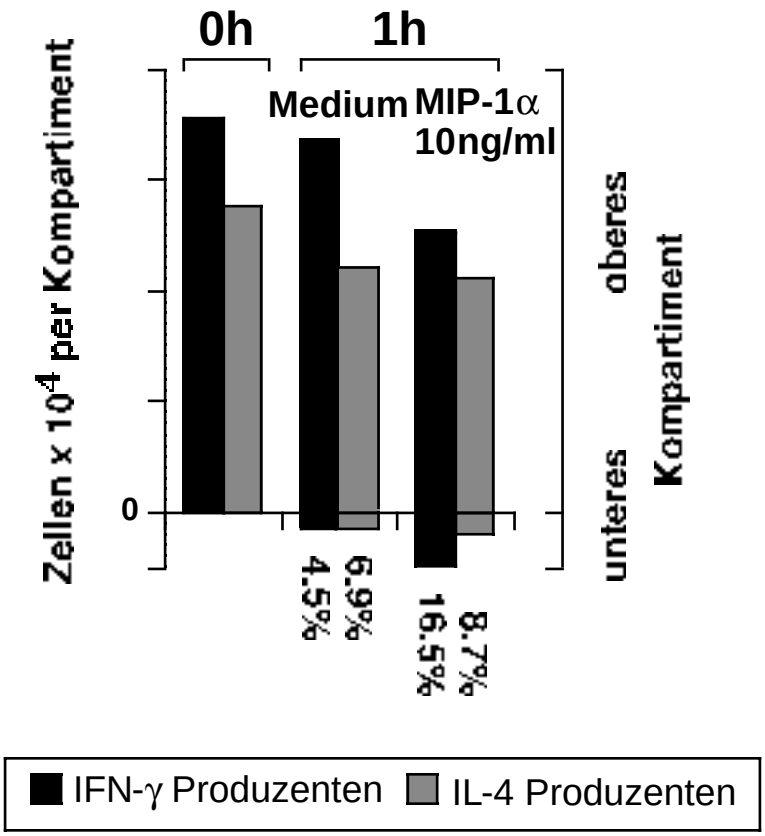


Abbildung 10. Spezifische Reaktion von IFNγ-Produzenten auf MIP-1α. *In vitro* generierte Th1- und Th2-Zellen wurden gemischt und im Chemotaxis-Assay mit Medium oder 10 ng/ml MIP-1α eingesetzt. Anschließend wurden die Ausgangspopulation sowie die Zellen im oberen und unteren Kompartiment gesammelt, restimuliert und eine intrazelluläre Zytokinfärbung mit anti-IL4 und anti-IFNγ durchgeführt. Der prozentuale Anteil der migrierten Zellen an der jeweiligen Population ist gezeigt.

Um zusätzlich auszuschließen, daß die Migration durch Chemotaxis und nicht durch Chemokinese, d.h. die ungerichtete induzierte Bewegung von Zellen, ausgelöst wurde, wurde eine sogenannte “checkerboard analysis” durchgeführt. Wie in Abbildung 11 zu sehen, konnte die Migration von Th1-Zellen auf MIP-1α komplett geblockt werden, wenn MIP-1α oder MIP-1β in einer Konzentration von 100 ng/ml dem oberen Kompartiment zugefügt wurden. Die Blockade der Migration sowohl durch MIP-1α als auch MIP-1β läßt vermuten, daß beide Chemokine den gleichen Rezeptor benutzen.

Der blockierende Effekt auf die Migration wird auf den schnellen Ausgleich des chemotaktischen Gradienten zurückgeführt. Allerdings läßt sich nicht ausschließen, daß die verminderte Migration nicht auch z.B. durch den weiter oben beschriebenen Vorgang der „Desensitization“ erfolgte. Um klarere Evidenz für eine chemotaktische Migration zu haben und eine „Desensitization“ des Rezeptors auszuschließen, müßte bei z.B. um eine log-Stufe höherer Konzentration im unteren Kompartiment bei gleichzeitig hohen Konzentrationen in beiden Kammern eine Migration der Zellen zu beobachten sein. Hierzu erfolgte jedoch kein Versuch. Indirekte Effekte durch Chemokine wie z.B. die Induktion der Synthese anderer löslicher chemotaktischer Faktoren schließt die kurze Inkubationszeit des Assays nahezu aus.

Ein abschließendes Experiment galt der Untersuchung, inwieweit naive $CD4^+$ T-Zellen, die die Ausgangspopulation zur Generierung der Th1/Th2-Effektorzellen darstellen, auf eines der untersuchten Chemokine reagieren. Wie in Abb. 12 zu sehen, zeigten naive $CD4^+$ T-Zellen keine gesteigerte Migration auf das Chemokin MIP-1β.

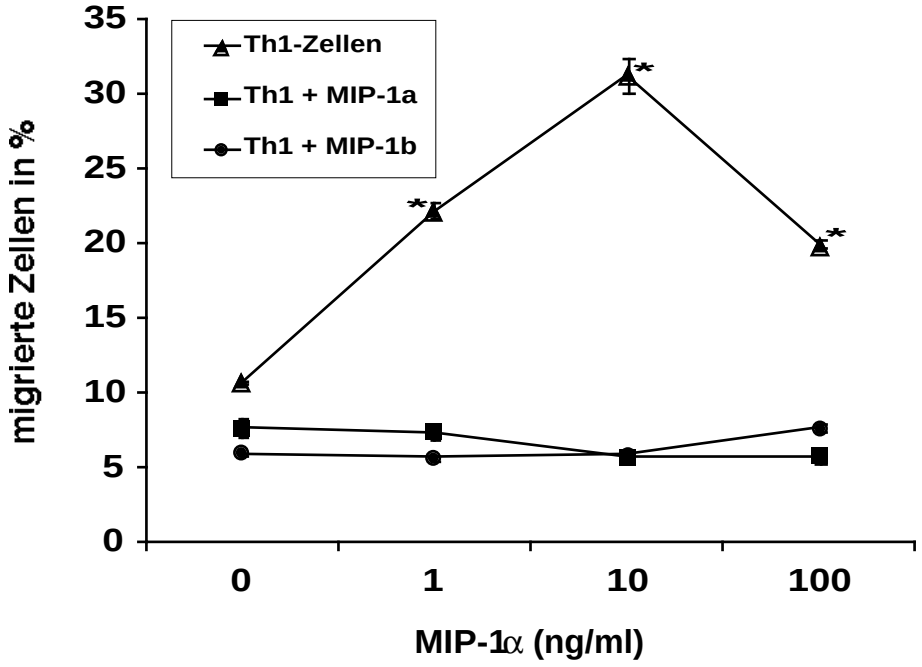


Abbildung 11. Blockade der Th1-spezifischen Migration. Die Differenz zwischen basaler und Chemokin-induzierter Migration (*) war signifikant mit $p < 0.05$. Zugabe der Chemokine MIP-1α oder MIP-1β (100 ng/ml) zu Th1-Zellen vor Einsatz im Chemotaxis-Assay blockiert die MIP-1α-induzierte Chemotaxis vollständig. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen.

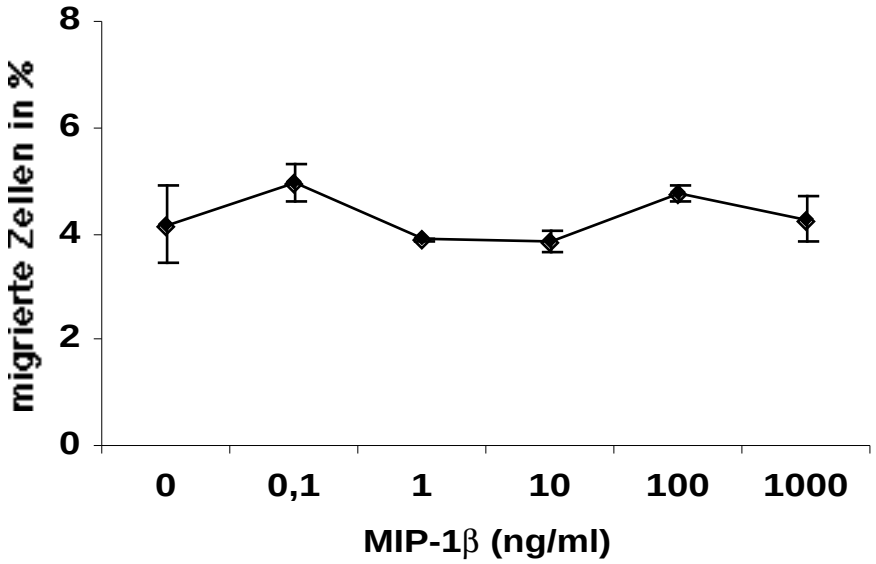


Abbildung 12. Naive $CD4^+$ T-Zellen zeigen keine MIP-1β-induzierte Chemotaxis. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen.

3.3.2 Th1- und Th2-Zellen migrieren gegenüber JE/MCP-1, zeigen jedoch kaum Chemotaxis auf andere CC-Chemokine wie Eotaxin oder TARC

Zur Frage, ob auch andere CC-Chemokine eine selektive Migration von Th1- oder Th2-Zellen auslösen können, untersuchten wir JE, das murine Homolog zu dem humanen Chemokin MCP-1. Dieses CCR-2 bindende Chemokin (Kurihara und Bravo, 1996) konnte in vielen entzündlichen Erkrankungen wie Atemwegserkrankungen, Glomerulonephritiden, Erreger-bedingten Infektionen oder auch Arteriosklerose nachgewiesen werden und scheint eine wichtige Rolle innerhalb der Entzündungsreaktion zu spielen.

Im chemotaktischen Assay konnte eine Aktivität sowohl von Th1- als auch Th2-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13b). Obwohl die Migration von Th1-Zellen ähnlich gesteigert werden konnte wie durch MIP-1α und MIP-1β, waren höhere Konzentrationen erforderlich. So konnte bei 1000 ng/ml ein etwa dreifacher Anstieg der Migration über die Spontanmigration beobachtet werden. Insofern erscheint JE/MCP-1 so effektiv[1], nicht jedoch so potent[2] wie MIP-1α und MIP-1β für Th1-Zellen. Th2-Zellen zeigten insgesamt eine geringere Migration in einem schmaleren Dosisbereich. Die Migration bei 10 ng/ml konnte dabei zwischen 1,5 und 2,2 mal über die basale Spontanmigration gesteigert werden (Abb. 13b). In drei durchgeführten Experimenten war die maximale Migration von Th1-Zellen signifikant ($p < 0.05$) höher als von Th2-Zellen. So erscheint JE/MCP-1 chemotaktisch für beide Zellpopulationen mit Präferenz für Th1-Zellen bei hohen Konzentrationen.

Als weiteres CC-Chemokin wurde Eotaxin getestet, das ein Ligand für CCR-3 ist. Dieser Rezeptor wurde als selektiv auf Th2- aber nicht Th1-Zellen exprimiert beschrieben (Sallusto et al., 1997). Dazu passend konnten wir keine Effekte auf die Migration von Th1-Zellen nachweisen, doch waren auch die Effekte auf Th2-Zellen sehr gering (Abb. 13b). So zeigte sich nur bei einer Konzentration von 1000 ng/ml ein signifikanter Anstieg der Migration von basal 7.4% auf 10.3%, der nicht vergleichbar war mit der Chemotaxis von z.B. MIP-1α auf Th1-Zellen.

---

[1] Effektivität beschreibt den Grad der Chemokin-induzierten Migration.
[2] Potenz beschreibt die Wirksamkeit im Hinblick auf die Chemokinkonzentration.

Auch TARC, ein CC-Chemokin wurde als präferentiell chemotaktisch für Th2-Zellen beschrieben und hier für Th2-Zellen eines aktivierten Phänotyps. Es bindet an CCR-4, welcher auf Th2- aber nicht Th1-Zellen exprimiert sein soll. Da das Chemokin TARC nur in geringer Menge vorhanden war (freundlicherweise von Dr. Irmgard Förster, Köln zur Verfügung gestellt), konnte nur ein Versuch mit einem eingeschränkten Konzentrationsbereich durchgeführt werden. So wurden aktivierte Th1/Th2-Zellen mit ruhenden Th2-Zellen, d.h. der auch in den anderen Versuchen eingesetzten Zellpopulation, verglichen. In diesem Versuch zeigte sich bei keinem Zelltyp eine signifikante chemotaktische Reaktion (Abb. 13a).

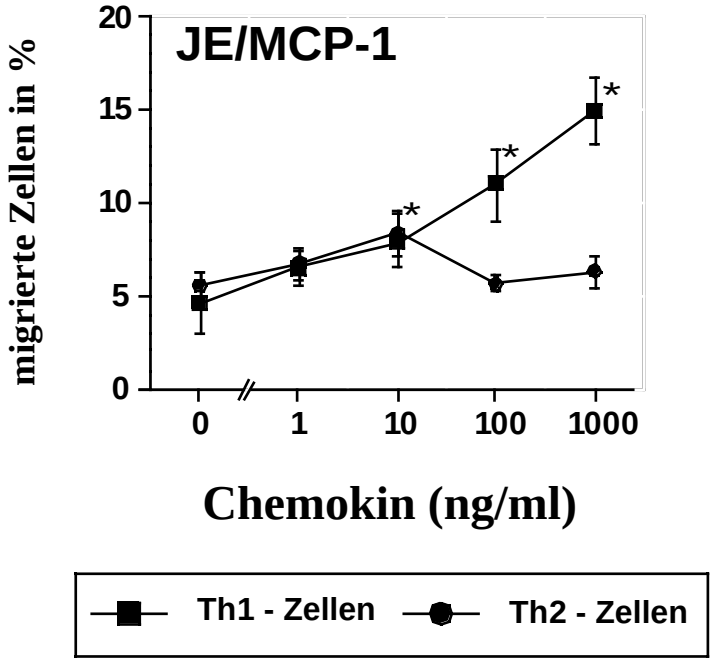


Abbildung 13a. Migration von Th1-/Th2-Zellen auf JE/MCP-1. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen eines repräsentativen von vier Experimenten.

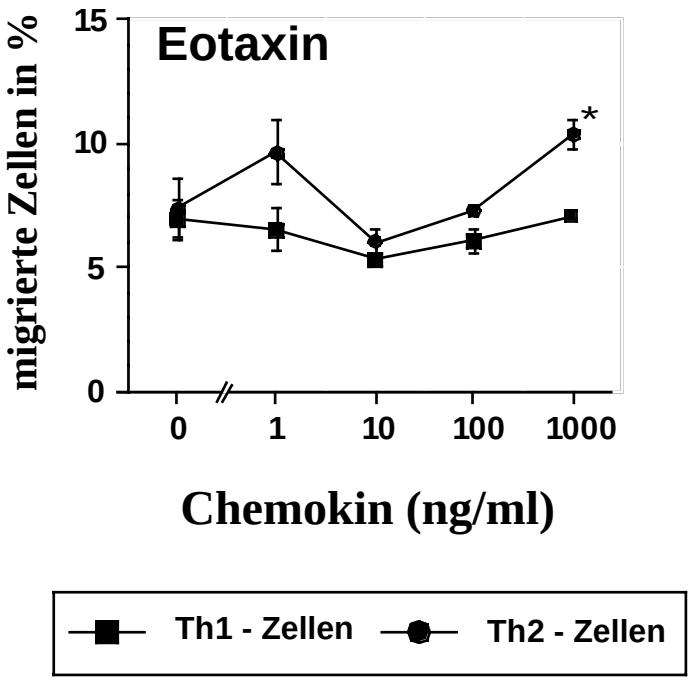


Abbildung 13b. Migration von Th1-/Th2-Zellen auf Eotaxin. Die Differenz zwischen basaler und Chemokin-induzierter Migration (*) war signifikant mit $p < 0.05$. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen eines repräsentativen von zwei Experimenten.

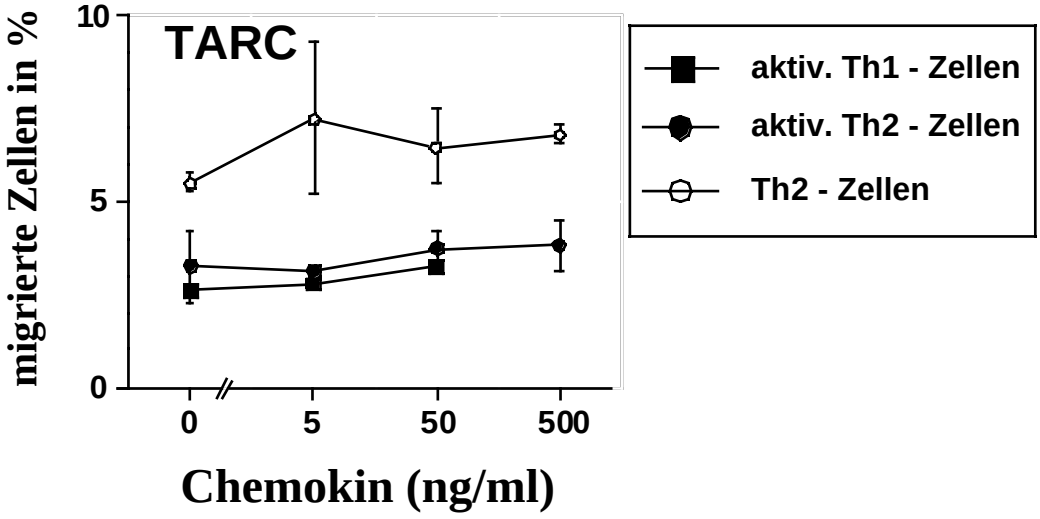


Abbildung 13c. Migration von Th1-/Th2-Zellen auf TARC. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen eines repräsentativen von zwei Experimenten.

3.3.3 SDF-1 zeigt die stärkste chemotaktische Aktivität für beide Subpopulationen unter allen getesteten Chemokinen

Als Vertreter der CXC-Chemokine, von denen viele auf neutrophile Granulozyten wirken, testeten wir SDF-1, CRG-2/IP-10, MIG und KC und humanes IL-8.

SDF-1, welches als sehr effektiv auf T-Lymphozyten wirkend beschrieben wurde (Bleul et al., 1996), induzierte die höchste Migration von allen getesteten Chemokinen. Bei 1000 ng/ml migrierten 15% der Th1- und 39% der Th2-Zellen, während bei niedrigeren Konzentrationen kaum Effekte gesehen wurden (Abb. 14). Interessant ist, daß dieses Chemokin deutlich höhere Konzentrationen als etwa die CC-Chemokine MIP-1α oder MCP-1 für die Induktion von Chemotaxis benötigt. So war in keinem der durchgeführten Versuche eine erhöhte Migration der Zellen unter 100 ng/ml zu beobachten. Wurde Überstand der murinen Knochenmarks-Stromazellinie MS-5 eingesetzt, welche hohe Mengen an SDF-1 produziert (Bleul et al., 1996), migrierten bis zu 35% Th1-Zellen, während die Migration der Th2-Zellen vergleichbar mit der bei 1000 ng/ml blieb (Abb. 14).

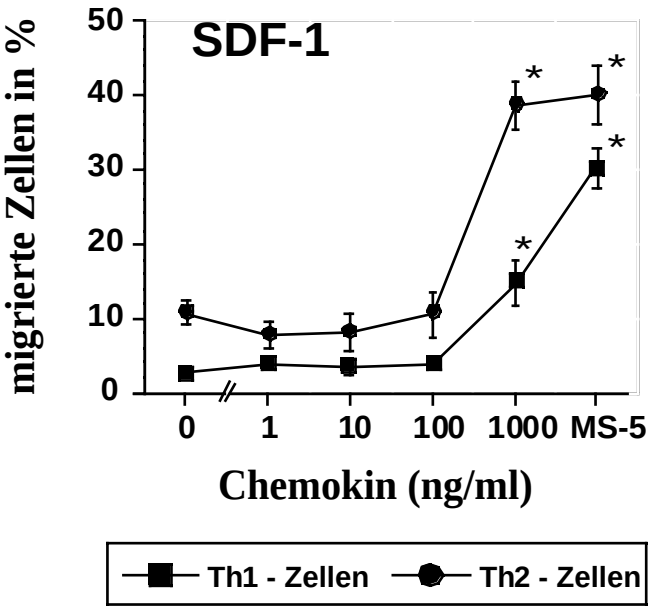


Abbildung 14. SDF-1 induziert Chemotaxis von Th1- und Th2-Zellen. Die Differenz zwischen basaler und Chemokin-induzierter Migration (*) ist signifikant mit $p < 0.05$. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung eines repräsentativen von vier Experimenten.

3.3.4 CRG-2/IP-10 und MIG zeigen eine geringe Aktivität auf Th1- aber nicht auf Th2-Zellen, während KC und humanes IL-8 keine chemotaktische Migration von Th1/Th2-Zellen induzieren

Andere CXC-Chemokine wie CRG-2, das murine Homolog zum humanen IP-10, und MIG, beide Liganden für CXCR-3 (Loetscher et al., 1996a; Tamaru et al., 1998), zeigten eine schwache, aber signifikante Aktivität für Th1-Zellen bei hohen Konzentrationen (1000 ng/ml), wogegen Th2-Zellen keine signifikant erhöhte Migration zeigten (Abb. 15).

Als ein klassisches CXC-Chemokin testeten wir KC, welches an das murine Homolog des IL-8 Rezeptor Typ B (CXCR2) bindet (Bozic et al., 1995) und möglicherweise das murine Homolog zum humanen GRO darstellt. Hier zeigte sich in einem von zwei Experimenten eine erhöhte Migration der Th1-Zellen (Abb. 15), diese bestätigte sich in einem zweiten Experiment jedoch nicht. Auch Th2-Zellen reagierten nicht chemotaktisch auf KC (Abb. 15). Humanes IL-8, von dem bis jetzt kein murines Homolog identifiziert werden konnte, zeigte keine Effekte auf Th1- oder Th2-Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Arbeiten, die zeigen, daß T-Lymphozyten nicht auf die CXC-Chemokine reagieren, die Liganden für CXCR-1 und CXCR-2 sind (Roth et al., 1995). Hauptzielzellen dieser Chemokine sind neutrophile Granulozyten.

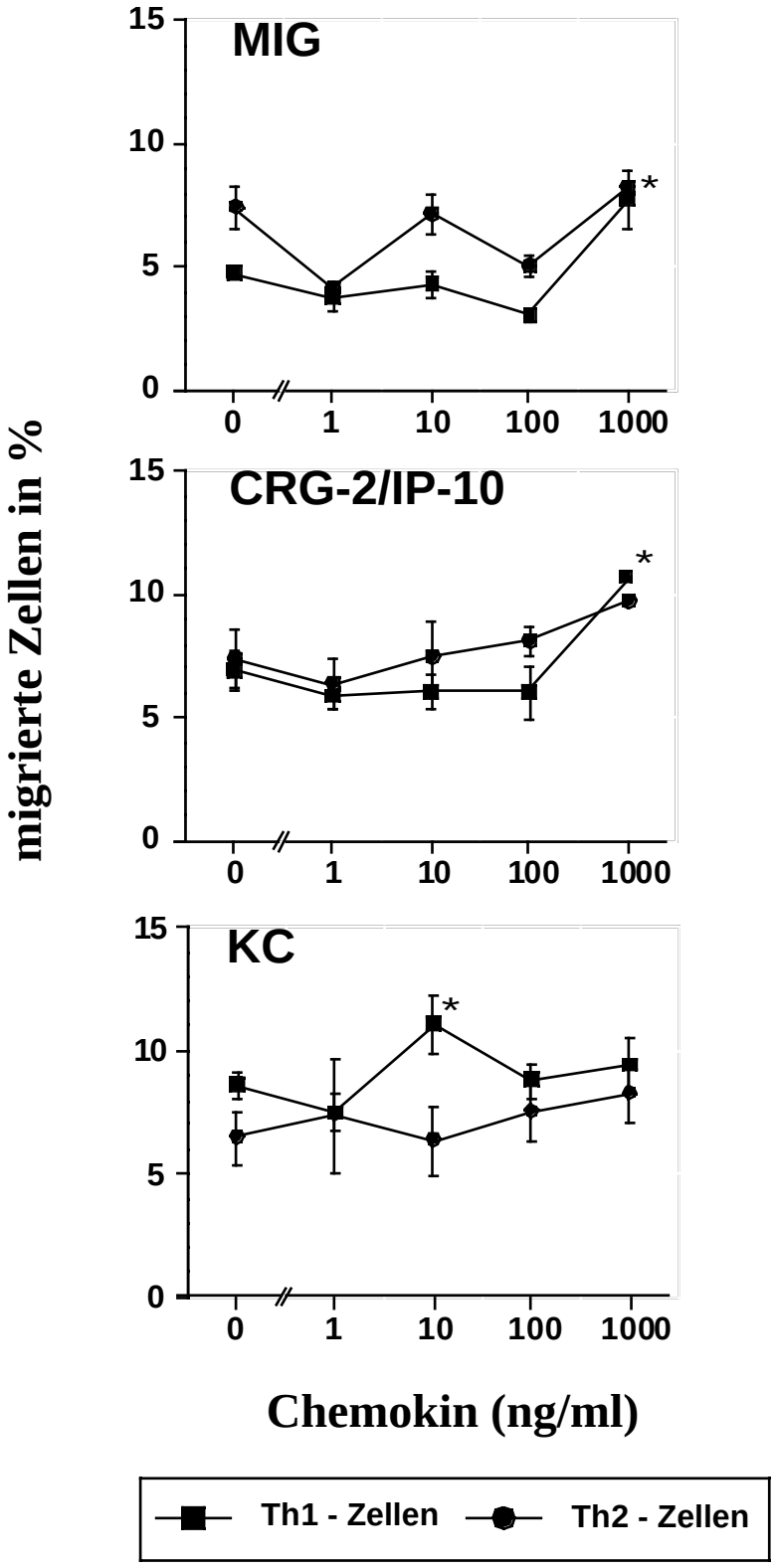


Abbildung 15. Migration von Th1-/Th2-Zellen auf die CXC-Chemokine MIG und CRG-2/IP-10 und KC. Die Differenz zwischen basaler und Chemokin-induzierter Migration (*) war signifikant mit $p < 0.05$. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils drei Ansätzen eines von zwei Experimenten.

3.4 Untersuchungen zur Chemokinrezeptor-Expression von Th1- und Th2-Zellen

Nachdem in den funktionellen Versuchen mittels Chemotaxis-Assay eine unterschiedliche Reaktivität von Th1- und Th2-Zellen festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit diese sich in dem Chemokinrezeptorstatus der Zellen widerspiegelt. Hierzu wurde eine RT-PCR etabliert und Primer für alle bis dato bekannten CC- und die auf T-Zellen exprimierten CXC-Chemokinrezeptoren hergestellt. Da die Gene für die hier untersuchten Chemokinrezeptoren keine Introns aufweisen, liegen die Primer für das jeweilige Gen im einzigen kodierenden Exon. Aus diesem Grund wurden folgende zwei Verfahren eingesetzt, um Artefakte durch potentielle Kontamination der RNA durch genomische DNA zu minimieren. Erstens wurde der RT-PCR ein DNase-Verdau vorangestellt und zweitens als Kontrolle begleitend eine PCR ohne vorhergehende RT durchgeführt. Zeigten sich in der Kontrolle keine Banden, wurden die PCR-Produkte als cDNA-Amplifikation gewertet. Eine ausführlichere Diskussion der methodischen Problematik findet sich im Diskussionsteil.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, zeigten Th1- und Th2-Zellen, welche zum gleichen Zeitpunkt wie die im Chemotaxis-Assay eingesetzten Zellen gemessen wurden, eine unterschiedliche Expression von Chemokinrezeptoren. So zeigten Th1-Zellen eine starke und präferentielle Expression von CCR-5, wohingegen Th2-Zellen eine sehr schwache Expression zeigten. CCR-5 bindet RANTES, MIP-1α und MIP-1β. Der zweite gut charakterisierte Rezeptor für MIP-1α und RANTES jedoch nicht MIP-1β, CCR-1 (Gao und Murphy, 1995), wurde weder auf Th1- noch auf Th2-Zellen exprimiert. Ein anderes wichtiges inflammatorisches Chemokin, MCP-1 bzw. sein murines Homolog JE, bindet an CCR-2 respektive an den JE-Rezeptor (Kurihara und Bravo, 1996). In unseren Versuchen zeigten Th2-Zellen ein schwaches Signal, Th1-Zellen jedoch nicht.

Zusätzlich wurden zwei Chemokinrezeptoren untersucht, deren Liganden im Chemotaxis-Assay nicht so intensiv untersucht wurden, für die jedoch eine präferentielle Expression auf Th2-Zellen beschrieben wurde: CCR-3 (bindet Eotaxin) und CCR-4 (bindet TARC). Für CCR-4 zeigte sich hier ähnlich der CCR-2-Expression ein schwaches Signal für Th2- aber nicht Th1-Zellen. Interessant ist, daß sich in keinem der Versuche eine Expression von

CCR-3 auf den Zellen zeigte. Dieses gilt auch für andere Zellpopulationen wie naive $CD4^+$ T-Zellen oder aktivierte Effektorzellen (siehe unten), Als Zeichen dafür, daß die Primer funktionierten, zeigten sich in Versuchen mit genomischer DNA bei allen Rezeptoren (falsch) positive Banden der berechneten Größe (hier nicht gezeigt).

Von den bisher beschriebenen CXC-Chemokinrezeptoren sind CXCR-3 (bindet IP-10 und MIG) und CXCR-4 (bindet SDF-1) auf T-Zellen exprimiert; CXCR-3 wird hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen vom Th1-Typ (Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1998) und CXCR-4 von nahezu allen lymphozytären Populationen exprimiert. Bisher beschrieben ist die Expression auf Progenitorzellen, Thymozyten, naiven B- und T-Zellen sowie auf aktivierten/Memory-Lymphozyten (Heesen et al., 1997; Möhle et al., 1998). In Versuchen mit verschiedenen Th1/Th2-Ansätzen zeigte sich für CXCR-3 ein uneinheitliches Bild. So war für beide Subpopulationen eine Expression zu beobachten, diese war jedoch mal stärker auf der einen und mal stärker auf der anderen Population. Diese Unterschiede zwischen zwei Experimenten (wie in Abb. 16 zu sehen) galt nur für CXCR-3 und spiegelt möglicherweise die Abhängigkeit der Expression vom Aktivierungsstadium der Zellen wider. Anders die Expression von CXCR-4. Hier zeigte sich in allen Experimenten eine Expression auf Th2-Zellen und keine oder ein deutlich schwächeres Signal für Th1-Zellen (Abb. 16). Diese Präferenz war überraschend angesichts der in der Literatur bisher beschriebenen konstitutiven Expression von CXCR-4 auf Lymphozyten.

Weiterführend wurde der Rezeptorstatus von Th1/Th2-Zellen zu einem früheren Zeitpunkt sowie von frisch präparierten, unstimulierten $CD4^+$ T-Zellen. Hier konnte bei Versuchen mit aktivierten Th1-/Th2-Zellen an Tag zwei, bzw. Tag vier, nach Protokoll ein unterschiedliches Expressionsmuster für die untersuchten CC-Chemokinrezeptoren CCR-1, -3 und CCR-5 beobachtet werden. In einem Versuch mit zwei Tage aktivierten und danach noch zwei Tage kultivierten Effektorzellen zeigte sich keine Expression dieser CC-Chemokinrezeptoren bei positiven Signalen für CCR-2 auf Th1-Zellen und den CXC-Rezeptoren für beide Subpopulationen (s. Abb. 17. Anmerkung: Die Thymozyten in dieser Abbildung wurden für ein anderes Projekt analysiert und sind hier nur aus Gründen der Übersichtlichkeit im Bild enthalten.). Bei Effektorzellen, welche nach Tag zwei des Generierungsprotokolls untersucht wurden, war CCR-1 positiv für Th1- und CCR-5

positiv für Th1- und Th2-Zellen (Abb. 18). CCR-3 zeigte in beiden Experimenten keine Expression.

Ähnlich dem Ergebnis bei den ruhenden Effektorzellen waren die Ergebnisse für die beiden untersuchten CXC-Chemokinrezeptoren CXCR-3 und CXCR-4 bei vier Tage kultivierten Zellen, welche IL-2-Rezeptor positiv waren. So war die mRNA-Expression von CXCR-4 bei Th2-Zellen deutlich und bei Th1-Zellen sehr schwach positiv, während CXCR-3 stärker auf Th1-Zellen exprimiert wurde (Abb. 17). Ein anderes Bild zeigte sich bei den frisch aktivierten Zellen, bei denen nur Th1-Zellen CXCR-3 und –4 exprimierten (Abb. 18).

In zwei Experimenten mit unstimulierten $CD4^+$ T-Zellen konnte trotz funktionierender Kontrolle, d.h. ohne Amplifizierung des Ausgangsmaterial in einer PCR ohne vorherigen RT-Schritt, kein Signal für das HPRT-Gen beobachtet werden. Da jedoch die Experimente mit unabhängigen Präparationen der Zellen eine Amplifikation von Chemokinrezeptoren-mRNA zeigten, werden die Ergebnisse hier gezeigt. So exprimierten unstimulierte $CD4^+$ T-Zellen in beiden Versuchen CXCR-4 sowie unterschiedlich stark aber eindeutig CCR-4 (Abb. 17 und 19). Zusätzlich waren CCR-5 und CXCR-3 in jeweils einem Versuch positiv, während alle anderen untersuchten Rezeptoren, CCR-1, -2 und -3, negativ waren.

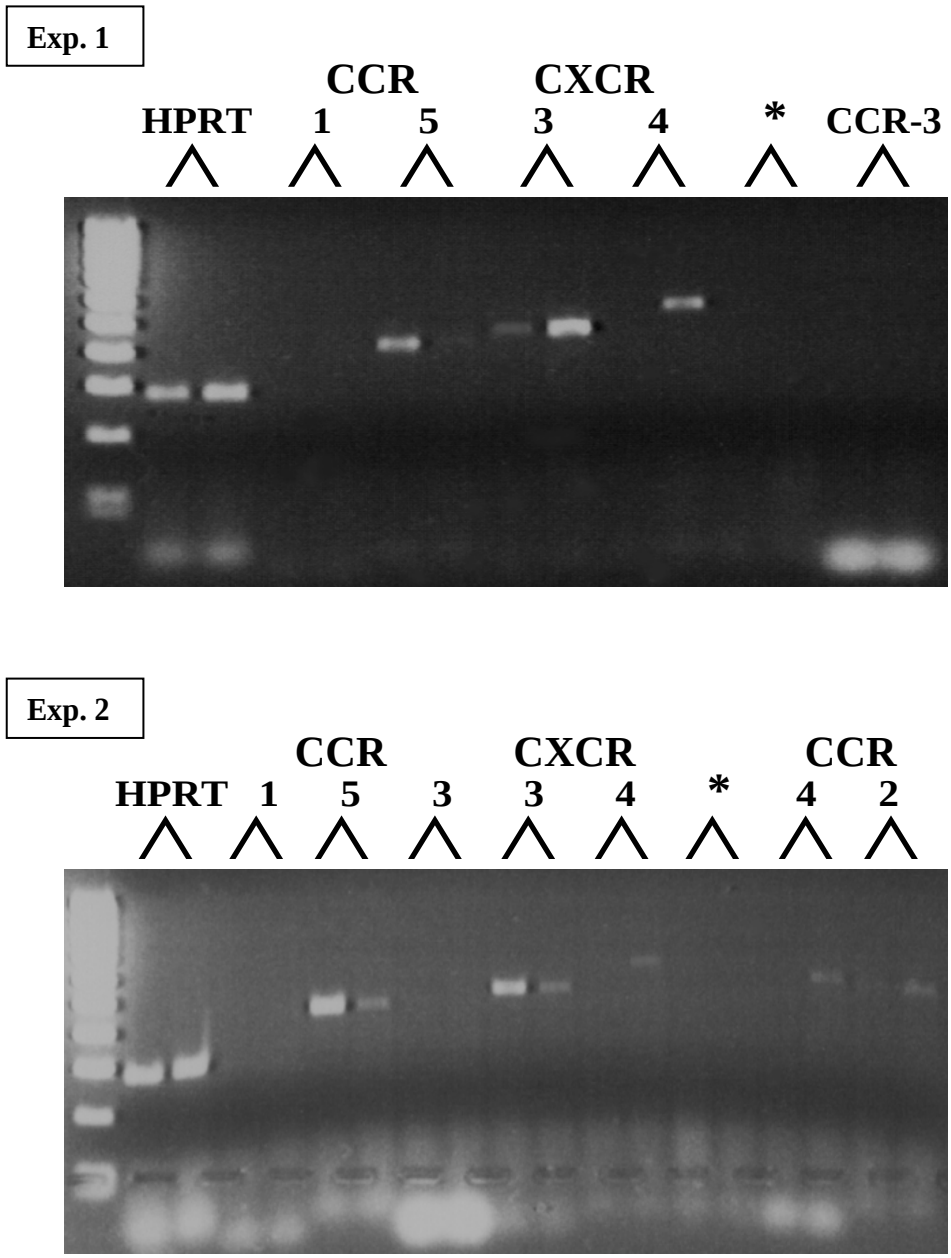
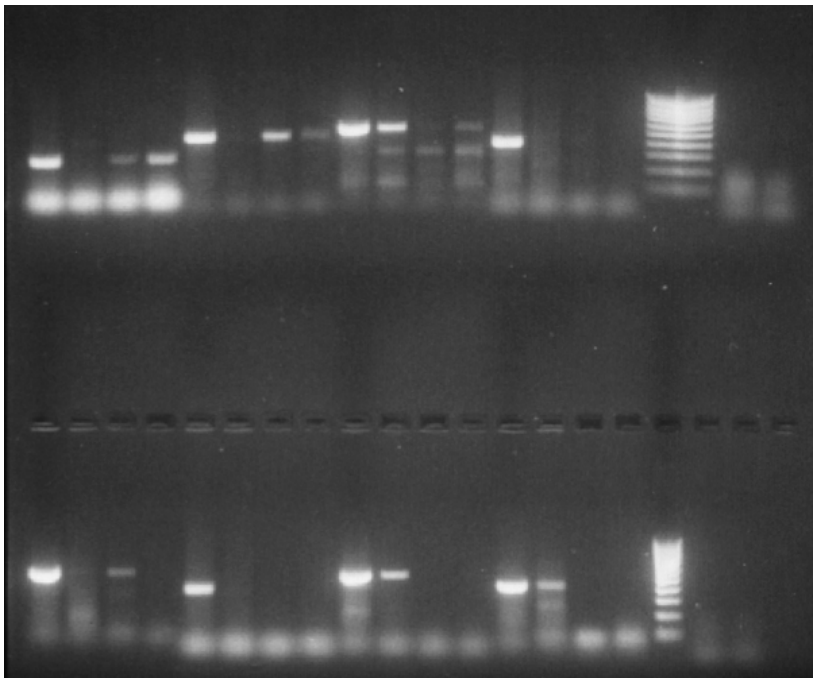


Abbildung 16. Chemokinrezeptor-Expression von Th1- und Th2-Zellen. Gezeigt sind 2 Experimente mit, unter gleichen Bedingungen generierten, ruhenden Effektorzellen an Tag 6 der Kultivierung. Die jeweils linke Bande jedes Bandenpärchens zeigt die Th1-, die rechte Bande die Th2-Rezeptor-Expression. Der jeweils amplifizierte Rezeptor ist oberhalb des Gels vermerkt. Die mit „*“ gekennzeichneten Banden zeigen die Kontroll-PCR ohne vorherige Reverse Transkription (RT). Alle Proben wurden vor der RT-PCR mit DNase behandelt.

HPRT CXCR-3 CXCR-4 CCR-1 * *



CCR-2 CCR-3 CCR-4 CCR-5 * *

Jedes Bandenquartet: **Thymozyt – unstimulierte CD4$^+$ – Th1 – Th2**

Abbildung 17. Chemokinrezeptorexpression von unstimulierten CD4$^+$ T-Zellen und aktivierten Th1/Th2-Effektorzellen. Gezeigt ist die Rezeptorexpression frisch isolierter Thymozyten, CD4$^+$ T-Zellen aus Lymphknoten und 4 Tage kultivierter Th1/Th2-Zellen (siehe Text). Die mit „*“ gekennzeichneten Banden zeigen die Kontroll-PCR ohne vorherige RT. Es ist zu beachten, daß die eingesetzten RNA-Mengen nicht identisch sind, wie die Banden für die HPRT-Expression zeigen.

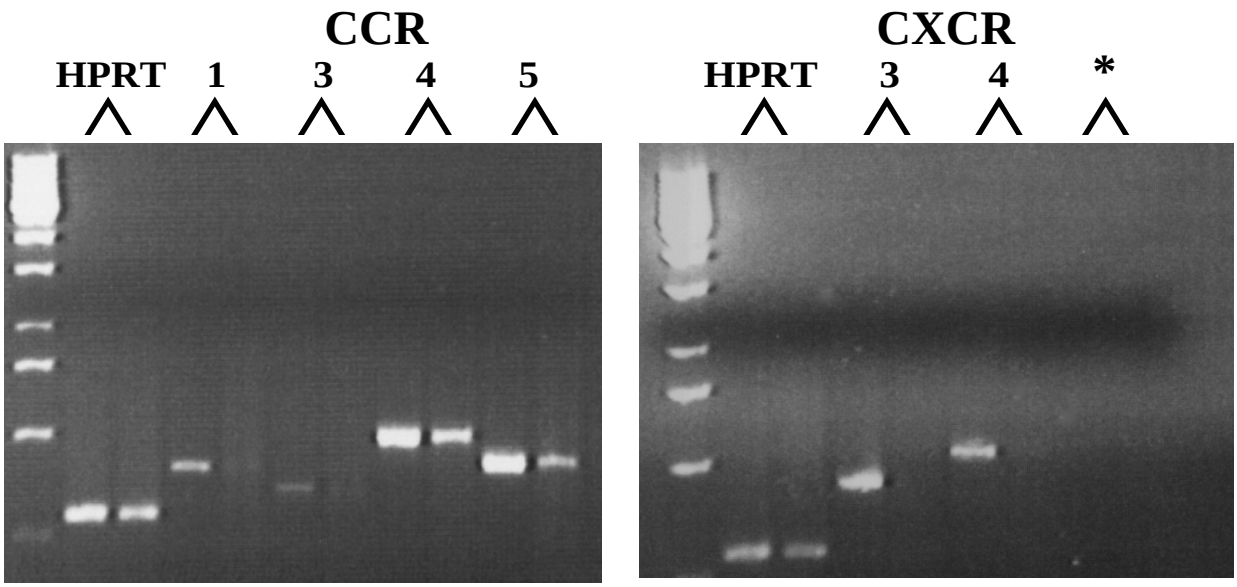


Abbildung 18. Chemokinrezeptorexpression von aktivierten Th1/Th2-Effektorzellen. Gezeigt ist die Rezeptorexpression von Th1/Th2-Effektorzellen nach 2 Tagen Aktivierung mit den entsprechenden Zytokinen. Die mit „*“ gekennzeichnete Bande zeigt die Kontroll-PCR ohne vorherige RT.

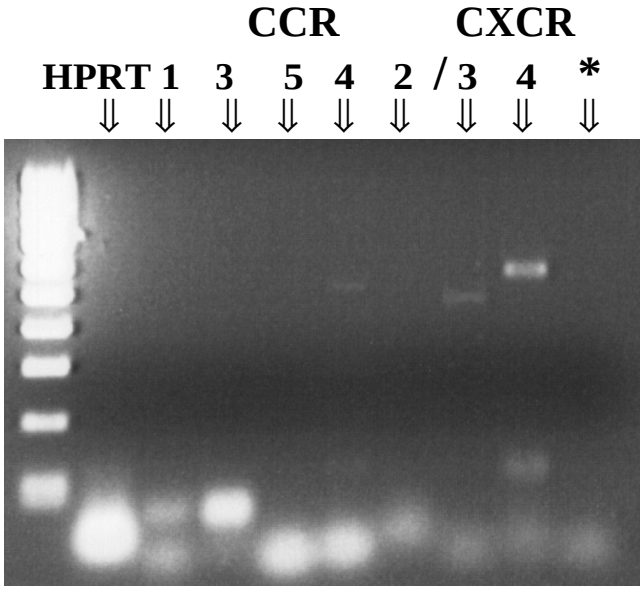


Abbildung 19. Chemokinrezeptorexpression von unstimulierten $CD4^+$ T-Zellen. Die mit „*“ gekennzeichnete Bande zeigt die Kontroll-PCR ohne vorherige RT.

4. Diskussion

In dieser Arbeit haben wir das Migrationsverhalten und das Potential zur Chemokin-induzierten Chemotaxis von Th1- und Th2-Zellen sowie die Expression einiger (zum Zeitpunkt der Arbeit relevanten) Chemokinrezeptoren auf diesen Populationen untersucht.
Um die Chemotaxis der T-Zellen zu beurteilen, wurde ein *in vitro* Transfilter-Assay etabliert. Eine erste wichtige Feststellung war die deutlich höhere Migration differenzierter, ruhender Th1- und Th2-Zellen im Vergleich sowohl zu naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten als auch zu aktivierten Th1/Th2-Zellen. Untersucht wurde die transmembrane Migration nach ein und vier Stunden, in denen die Migration von Effektorzellen kontinuierlich anstieg.
Dabei zeigten ruhende Effektorzellen im Vergleich zu aktivierten Effektorzellen eine erhöhte Migrationskapazität sowohl bei Th1- als auch Th2-Zellen. Für diese T-Zellen konnte in transfilträren und transendothelialen Migrationsstudien die höchste intrinsische Migrationskapazität gezeigt werden (Pietschmann et al., 1992). Bei Untersuchungen mit humanen Memoryzellen konnten Loetscher et al. IL-2 und auf niedrigerem Level auch IL-4 und IL-12 als pro-migratorische Faktoren identifizieren, während eine reduzierte Migration von T-Lymphozyten nach Behandlung mit anti-CD3 zu beobachten war (Loetscher et al., 1996b). Dabei erhöhten T-Zellen nach Induktion durch IL-2 und andere differenzierende Zytokine wie IL-4 oder IL-12 ihre Migrationskapazität durch Expression von Chemokinrezeptoren. Die höhere Migration länger kultivierter und damit differenzierterer Effektorzellen ist hierbei wahrscheinlich auf die der Aktivierungsphase folgende Induktion von pro-migratorischen Zellmolekülen zurückzuführen.
Auf insgesamt deutlich niedrigerem Niveau und mit einer anderen Kinetik verlief die Migration von naiven $CD4^+$ T-Zellen. Diese zeigten nach vier Stunden keinen weiteren Anstieg im Vergleich zur einstündigen Migration. Eine Erklärung hierfür liegt möglicherweise in einer kleinen Fraktion an Memory-Lymphozyten innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen. Diese werden durch die in dieser Arbeit verwendete Zellselektion nicht herausgefiltert, da Memory-Lymphozyten ebenso wie naive T-Lymphozyten nicht den IL-2-Rezeptor (CD25) tragen. Es wäre denkbar, daß diese Zellfraktion, welche normalerweise 10-20% der Gesamtzellen ausmacht, migratorisch aktiver ist als naive Zellen. Diese Hypothese wird von Arbeiten zur Korrelation von Migrationskapazität und

Differenzierungsstadium von T-Zellen unterstützt (Pietschmann et al., 1992; Röhnelt et al., 1997). Die Memory-Lymphozyten wären dann überwiegend für den Migrationsanstieg in der ersten Stunde verantwortlich, aufgrund der begrenzten Zellzahl würde dann jedoch die Zahl migrierter Zellen ein Plateau erreichen. Die Klärung dieser Frage könnte durch eine weitere Auftrennung der $CD4^+$ T-Zellen mit Abtrennung der Memory-Lymphozyten oder eine Zellphänotypisierung in oberem und unterem Kompartiment des Assays versucht werden.

Eine weitere Beobachtung war die unterschiedliche spontane Migration der differenzierten Effektorzellen. Diese war höher bei Th2- als bei Th1-Zellen, was sich in verschiedenen Ansätzen mit unbeschichteten, Fibronektin-beschichteten und Endothel-beschichteten Filtern bestätigte. Diese Ergebnisse weisen auf eine höhere intrinsische Migrationskapazität von Th2-Zellen hin. Da dieser Unterschied bei gleichem, bzw. sehr ähnlichem Aktivierungsstadium der Zellen auftrat, könnte dieses Ergebnis einen Hinweis auf funktionelle Unterschiede der Zelltypen geben. Inwieweit und ob die spontane Migration *in vivo* von Bedeutung ist, ist unklar, zumal sie schwer von Faktoren wie der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Antwort auf Chemokine zu trennen ist. Bisherige Untersuchungen *in vivo* zeigten keine gravierenden Unterschiedliche im Homing von Th1- und Th2-Zellen in nicht-entzündliche Gewebe (Austrup et al., 1997).

Versuche, diese Effekte auf bestimmte Oberflächenrezeptoren, und hier vor allem auf Integrine, zurückzuführen, zeigten, daß sich die Migration beider Zelltypen im Migrationsassay mit Fibronektin-beschichteten Filtern durch Zugabe von Antikörpern gegen die α4- und α6-Kette verringern lies. Diese Verringerung der Migration war bei Th2-, nicht aber bei Th1-Zellen signifikant. FACS-Analysen aus diesem Labor, durchgeführt von Dr. Frank Austrup, zeigten keine Unterschiede in der Expression von β1-, β7-, α4β7- und αE-Ketten. Fluoreszensfärbungen von α4- und αV-Ketten zeigten allerdings eine in mehreren Versuche nachweisbare Erhöhung der mittleren Fluoreszensintensität auf Th2-Zellen. Möglich ist, daß die migrierenden Th2-Zellen eine höhere Expression oder Aktivierung von bestimmten Integrinen zeigen.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit war die unterschiedliche chemotaktische Antwort von Th1- und Th2-Zellen auf Chemokine. Hier zeigte sich, daß eine Reihe von Chemokinen wie MIP-1α, MIP-1β und RANTES eine deutlich höhere chemotaktische Aktivität in Th1- als in Th2-Zellen induzieren konnten. Alle drei Chemokine waren in der Lage, Chemotaxis in Th1-Zellen auszulösen, während Th2-Zellen bei MIP-1α keine, bzw. bei MIP-1β und RANTES nur eine geringfügig erhöhte Migration zeigten. Stattdessen war bei hohen Konzentrationen von MIP-1α eine signifikante Reduktion in der Migration von Th2-Zellen zu beobachten, ein Effekt, der unseren Wissens noch nicht für T-Zellen beschrieben wurde. Dabei war die reduzierte Migration sowohl bei aktivierten als auch ruhenden Th2-Zellen zu beobachten. Für Ursachen der beobachteten verminderten Migration durch z. B. ein inhibitorisches Signal der spontanen Zellmotilität oder eine Änderung der Adhäsionseigenschaften der Th2-Zellen gibt es bis dato allerdings keine Hinweise.

Um zu verifizieren, daß die beobachtete spezifische Migration tatsächlich für die aktuellen Zytokinproduzenten galt, haben wir in einem Kontrollversuch die Zytokinproduktion der eingesetzten und transmigrierten Zellen untersucht. Dadurch war es möglich, die Migration der Zellen zu beurteilen, die vollständig polarisiert sind und sich im Effektorzellstadium befinden. Hier zeigte sich das gleiche Bild wie mit den Gesamtzellen der Kultur: Die chemotaktische Antwort auf MIP-1α war nur bei IFNγ-Produzenten zu finden und nicht, bzw. nur in viel geringerem Maß bei IL-4-Produzenten. Zeitgleich mit dieser Arbeit wurden auch in anderen Untersuchungen ähnliche Ergebnisse mit humanen Th1- und Th2-Zellen beschrieben (Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1998).

MIP-1β zeigte sich dem MIP-1α in chemotaktischer Potenz und Effizienz auf Th1-Zellen sehr ähnlich, induzierte jedoch in hohen Konzentrationen auch bei Th2-Zellen eine in drei unabhängigen Experimenten signifikant erhöhte Migration. Diese war nicht so hoch wie die der Th1-Zellen und war nur bei einer Konzentration von 1000 ng/ml zu beobachten. Beide Chemokine haben zum Teil überlappende Funktionen wie Chemotaxis und Aktivierung vieler Zelltypen als auch unterschiedliche Funktionen. So ist MIP-1α bisher einzigartig in seiner inhibitorischen Wirkung auf die hämatopoetische Stammzellproliferation. *In vivo* konnte eine nicht durch andere Chemokine zu ersetzende Funktion von MIP-1α für eine inflammatorische Reaktion auf eine virale Infektion demonstriert werden (Cook et al.,

1995). Frühe Untersuchungen zur Chemotaxis von T-Lymphozyten zeigten eine präferentielle Migration von $CD8^+$ T-Zellen zu MIP-1α und $CD4^+$ T-Zellen zu MIP-1β (Schall et al., 1993; Taub et al., 1993a).

MIP-1α und MIP-1β sind Liganden für CCR-5 (Meyer et al., 1996), wobei MIP-1α zusätzlich CCR-1 (Gao und Murphy, 1995) und CCR-9 bindet (Bernardini et al., 1998). Ob für die Präferenz der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen jedoch eine unterschiedliche Chemokinrezeptorexpression verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Warum Th2-Zellen in unseren Experimenten geringfügig chemotaktisch auf hohe Konzentrationen von MIP-1β reagierten, ist insofern unklar, als daß die Checkerboard-Analysen eher die Kompetition an dem gleichen Rezeptor vermuten ließen. Möglicherweise ist jedoch MIP-1β in der Lage, als funktioneller Agonist an einen anderen Rezeptor zu binden.

Als drittes präferentiell auf Th1-Zellen chemotaktisch wirkendes Chemokin konnte in dieser Arbeit RANTES identifiziert werden. Der bisher einzige Rezeptor, der sowohl MIP-1α, MIP-1β und RANTES bindet, ist CCR-5 (Meyer et al., 1996). Zusätzlich ist RANTES für CCR-1 und CCR-3 als Ligand beschrieben worden. In älteren Studien wurden MIP-1α und RANTES neben TARC und MDC auch als Liganden für CCR-4 beschrieben, doch scheinen nur TARC und MDC funktionelle Liganden für diesen Rezeptor zu sein (Imai et al., 1997; Imai et al., 1998). Für MIP-1β ist CCR-5 als einziger Rezeptor beschrieben, während es nicht, wie zunächst beschrieben, an CCR-8 bindet (Garlisi et al., 1999). Somit weisen schon die Chemotaxis-Versuche, in denen Th1-Zellen auf alle drei Chemokine mit einer sehr ähnlichen Migrationskinetik reagierten, auf CCR-5 als einen guten Kandidaten für die selektive Expression auf Th1-Zellen hin. Um direktere Aussagen über beteiligte Rezeptoren und ihre differentielle Expression auf den T-Zell-Subpopulationen zu erhalten, wurde eine RT-PCR zur Messung der Chemokinrezeptor-mRNA etabliert.

Die RT-PCR wurde in Abwägung zum Northern Blot zum einen wegen ihrer weitaus größeren Sensitivität gewählt. Dieses erscheint besonders wichtig, wenn nicht nur *in vitro* generierte Th1/Th2-Zellen, sondern auch *ex vivo* isolierte Effektorzellen untersucht werden sollen. Der Vorteil einer deutlich höheren Sensitivität macht die RT-PCR jedoch vor allem wegen des Umstandes, daß alle hier untersuchten Chemokinrezeptoren von nur einem Exon codiert werden, anfällig für falsch-positive Resultate. So besteht die Gefahr der Amplifikation kontaminierender genomischer DNA. Um dieses zu vermeiden, wurden zum einen die RNA-Präparationen vor Beginn der cDNA-Synthese mit DNase vorbehandelt, um bei einer möglichen DNA-Kontamination die konkurrierende DNA in nicht amplifizierte kleine Stücke zu verdauen. Zum anderen, und für die Sicherheit eines richtig-positiven Ergebnisses die wichtigere Kontrolle, wurde bei den durchgeführten Experimenten eine Reaktion im Sinne einer PCR des DNase-verdauten Ausgangsmaterials ohne vorherigen RT-Schritt durchgeführt. Alle gezeigten Ergebnisse zeigten keine PCR-Produkte in der Kontrollreaktion.

Zur Quantifizierung von mRNA stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Die einfachste Methode besteht darin, das Signal des jeweiligen Rezeptors mit dem eines mituntersuchten sogenannten „house-keeper gene“, eines in jeder Zelle vorhandenen abundant exprimierten Genes wie HPRT oder β-Actin, zu vergleichen. Dabei ist zu entscheiden, ob die Amplifizierung des „house-keeper gene“ in der gleichen Reaktion oder einem parallelen Ansatz ablaufen soll. Erstere Methode hat den Vorteil, daß die Amplifizierung von Kontroll- und Ziel-mRNA in der gleichen PCR-Reaktion ablaufen und damit Variationen verschiedener Ansätze vermieden werden. Nachteil ist unter anderem, daß die zwei Primer-Paare ähnliche Annealing-Temperaturen haben müssen und keine komplementären Sequenzen besitzen dürfen.
Klar festzustellen bleibt, daß diese Methode nur unzureichende Vergleiche der quantitativen Expression zuläßt und nach heutigen Standards unzureichend ist. Dieses vor allem deshalb, weil inzwischen eine Reihe genauerer Quantifzierungsmethoden zur Verfügung steht. Diese im einzelnen zu diskutieren sprengt den Rahmen dieser Arbeit, doch sei gesagt, daß die kompetitive RT-PCR, vor allem aber die sogennante „real time PCR“ als extrem akkurate Methoden zur Quantifizierung von mRNA zur Verfügung stehen (Reue, 1998).

Da in dieser Arbeit das eigentliche Thema die Untersuchung der Migration von Th1/Th2-Zellen war und die Etablierung einer funktionierenden RT-PCR wegen der doch überraschenden differenziellen Antwort der Zellen auf Chemokine und als Grundlage für weitere Arbeiten anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe als zusätzlicher und ergänzender Teil durchgeführt wurde, konnten diese neueren Quantifizierungstechniken vor allem im Hinblick auf den zeitlichen Rahmen nicht berücksichtigt werden. Somit haben die in dieser Arbeit gemachten Aussagen zu einer unterschiedlichen Expression der untersuchten Rezeptoren auf Th1- und Th2-Zellen eher einen tendenziellen und vorläufigen Charakter. Sie stehen allerdings in Einklang mit publizierten Daten ähnlicher Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wie nachfolgend diskutiert. Auch die Expression von CXCR-4 auf frisch präparierten und zum größten Teil naiven $CD4^+$ T-Zellen, die so auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Sallusto et al., 1998), zeigt, daß diese Methode zum jetzigen Zeitpunkt vor allem als „Screening-Tool“ betrachtet werden kann, wobei für genauere Aussagen andere Quantifizierungsmethoden (s.o.) sowie eine bessere Auftrennung der zu untersuchenden Populationen erforderlich sind.

Eine weitere, jedoch nicht nur für die Untersuchung der Rezeptorexpression geltende Schwierigkeit bestand bei den Experimenten mit frisch präparierten naiven $CD4^+$ T-Zellen in dem Anteil an Memory-Lymphozyten innerhalb der Population, welche sich nur mit methodisch aufwendigeren Techniken abtrennen läßt. Dieser Umstand könnte auch für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen gleichen Experimenten verantwortlich sein, die zum Teil bei naiven $CD4^+$ T-Zellen und auch bei aktivierten T-Effektorzellen zu beobachten waren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Rezeptorstudien zeigten eine präferentielle Expression von CCR-5 auf differenzierten Th1-Zellen. Zwar war auch für Th2-Zellen ein Signal zu sehen, doch war dieses deutlich schwächer als für Th1-Zellen.

Parallel zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte im Humansystem in zwei Untersuchungen eine präferentielle Expression von CCR-5 auf Th1-Zellen beschrieben werden (Loetscher et al., 1998; Bonecchi et al., 1998), während in einer anderen Arbeit die Expression zusätzlich vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig war (Qin et al., 1998). So konnten Qin et al. mit Hilfe eines spezifischen Antikörper CCR-5 auf kürzlich aktivierten T-Zellen

nachweisen. Allerdings wurden hier periphere T-Lymphozyten und nicht die spezifischen Effektorzellpopulationen untersucht. Es ist weiterhin noch nicht geklärt, inwieweit die Expression von der Aktivierung der Zellen abhängig ist und wie der Rezeptor reguliert wird. Eine frühe Arbeit konnte die Hochregulierung von CCR-1 und CCR-2 (Loetscher et al., 1996b) sowie CCR-5 (Bleul et al., 1997) auf T-Lymphozyten durch IL-2 zeigen. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht mit Th1- und Th2-Zellen durchgeführt worden. Neuere Studien an Th1/Th2-Zellen zeigten eine Hochregulierung von CCR-5 durch IL-2 (Sallusto et al., 1998). Obwohl die in dieser Arbeit eingesetzten Zellen sich in einem ruhendem Zustand ohne oder nur geringer Expression des IL-2-Rezeptors befanden, könnte in der Aktivierungsphase produziertes IL-2 CCR-5 auf Th1-Zellen induzieren.

Die geringen Effekte von RANTES und MIP-1β auf Th2-Zellen könnten für die Präsenz anderer Rezeptoren auf Th2-Zellen sprechen, welche nicht MIP-1α binden. CCR-3 bindet Eotaxin und RANTES, und die selektive Expression von CCR-3 auf humanen Th2-Zellen ist beschrieben worden (Sallusto et al., 1997). In dieser Arbeit konnte allerdings nur eine sehr schwache chemotaktische Wirkung von Eotaxin für Th2- aber nicht Th1-Zellen festgestellt werden. Die anschließende Untersuchung mittels RT-PCR zeigte keine mRNA für CCR-3 in beiden Zelltypen. Dieses Ergebnis passt zu anderen Untersuchungen, die eine nur schwache und nicht auf allen Th2-Klonen zu findende Expression auf humanen Th2-Zellen (Bonecchi et al., 1998) zeigten, so daß es sich hier möglicherweise um Unterschiede zwischen humanen und murinen Zellen oder in der Arbeit von Sallusto et al. auch um eine CCR-3 exprimierende Subpopulation vom Th2-Typ handeln könnte.

Für CCR-1, welcher ebenfalls RANTES bindet, zeigte sich in der RT-PCR keine Expression auf ruhenden Th1/Th2-Zellen. Dieses Ergebnis erhärtet die Hypothese einer möglichen Präferenz von CCR-5 auf Th1-Zellen.

Wie schon weiter oben erwähnt, konnten wir in der vorliegenden Arbeit die wichtige Rolle des Aktivierungs- und Differenzierungsgrades der eingesetzten Zellen für Chemotaxis und Chemokinrezeptorexpression beobachten. Unsere Beobachtung, daß voll aktivierte Zellen eine verminderte Chemotaxis zeigen, passt diesbezüglich zu anderen Untersuchungen. In Rezeptorstudien für einige CC-Chemokinrezeptoren konnte durch Aktivierung von T-

Lymphozyten *in vitro* mittels anti-CD3 eine verringerte Chemokinrezeptorexpression und chemotaktische Aktivität beobachtet werden (Loetscher et al., 1996b; Bleul et al., 1997).

Neuere Studien an Effektor- und Memoryzellen zeigen ein differenziertes Bild im Hinblick auf die Rezeptorexpression nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors. Allerdings gibt es durchaus Diskrepanzen zwischen einzelnen Studien, die möglicherweise auf die Benutzung unterschiedlicher Zellpopulationen, unterschiedliche Aktivierungsprotokolle mit unterschiedlich langer Stimulation oder auch auf eine unterschiedliche Methodik hinsichtlich der Messung der Rezeptorexpression/Chemotaxis zurückzuführen sind. Während in einer Studie CCR-2, CCR-5 und ,etwas langsamer, CXCR-3 aber nicht CXCR-4 auf einer Th1-Zellinie und CCR-2, -3, -5 und CXCR-3 und -4 auf einer Th2-Zellinie herunterreguliert wurden (Sallusto et al., 1999), war in einer anderen Studie die Expression von CCR-3 und -5 sowie CXCR-4 kaum, von CXCR-3 jedoch in $CD4^+$ Memory-Lymphozyten nach Aktivierung signifikant erhöht (Rabin et al., 1999). Die derzeit vielleicht aussagekräftigste Studie mit *in vitro* polarisierten Th1/Th2-Zellen zeigte nach einmaliger Aktivierung eine signifikante Erhöhung von CXCR-3 in beiden Zellpopulationen, während CCR-5 und CXCR-4 unverändert blieben. Nach einer zweiten Stimulation war CXCR-3 auf nahezu allen Zellen exprimiert, während die Expression von CCR-5 präferentiell auf Th1-Zellen anstieg und CXCR-4 kaum verändert war (Annunziato et al., 1999).

Insgesamt zeigen diese Studien, daß flexible Programme für die Expression von Chemokinrezeptoren existieren, die sowohl unter dem Einfluß differenzierender Zytokine stehen als auch abhängig sind von der Stimulation durch den T-Zell-Rezeptor. Die Regulierung dieser Programme ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Eine Schwierigkeit, die Regulation der Rezeptorexpression für Th1- und Th2-Zellen aufzuklären, liegt darin, daß für Untersuchungen von Zytokinproduzenten diese aktiviert werden müssen. Somit ist es nicht möglich, z.B. Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Zytokine und Chemokinrezeptoren durchzuführen, wodurch es methodisch schwierig wird, die Rezeptorexpression *ex vivo* isolierter Th1/Th2-Zellen zu bestimmen. Zwar geben Untersuchungen an *in vitro* polarisierten Th1/Th2-Zellen oder an Zellinien Hinweise auf mögliche Kandidaten für eine selektive oder präferentielle Expression, jedoch hat sich gezeigt, daß viele Ergebnisse an *in vitro* behandelten Effektorzellen sich nicht ohne weiteres auf *in vivo* differenzierte Zellen übertragen lassen. Allerdings geben diese und andere

Untersuchungen Hinweise darauf, daß einige Rezeptoren wie CCR-5 erst auf voll differenzierten Effektorzellen exprimiert werden, möglicherweise erst nach einer längeren Induktionsphase in Richtung auf einen stabilen Phänotyp, während andere Rezeptoren wie CXCR-3 aktivierungsabhängig schnell hoch- und herunterreguliert werden können.

In Versuchen mit JE/MCP-1, welches neben seiner Wirkung auf Monozyten auch chemotaktisch für $CD4^+$ T-Zellen vom aktivierten/Memory-Phänotyp ist (Carr et al., 1994; Loetscher et al., 1994), zeigte sich eine stärkere Migration von Th1-Zellen, wobei beide Zelltypen eine signifikante chemotaktische Reaktion zeigten. Interessant dabei war jedoch, daß Th1- und Th2-Zellen eine unterschiedliche Migrationskinetik und ein Migrationsmaximum bei unterschiedlichen Konzentrationen hatten. Dieses Ergebnis könnte für die Expression unterschiedlicher JE/MCP-1 bindender Rezeptoren sprechen. Bisher konnte für MCP-1 gezeigt werden, daß es als Ligand an CCR-2 bindet und dieser Rezeptor nicht durch MIP-1α aktivierbar war (Kurihara und Bravo, 1996). Die in dieser Arbeit mittels RT-PCR gefundene nur schwache Expression von CCR-2 auf Th2-Zellen und das Fehlen eines Signals von Th1-Zellen unterstützen zusammen mit der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurve der Populationen zu JE/MCP-1 die Hypothese der Expression eines anderen Rezeptors für JE/MCP-1 auf Th1-Zellen. Bisher ist MCP-1 jedoch nur noch für den humanen D6/CCR-9 als Ligand beschrieben worden, dessen murine Sequenz noch nicht veröffentlicht wurde. In bisherigen Studien zur Rezeptorexpression von humanen Th1- und Th2-Zellen konnte eine schwächere Expression von CCR-2 auf Th2- als auf Th1-Zellen demonstriert werden (Bonecchi et al., 1998). Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um die Expression und Regulation von CCR-2 und möglichen anderen JE/MCP-1 bindenden Rezeptoren auf Th1- und Th2-Zellen zu klären.

In weiteren Untersuchungen mit inflammatorischen Chemokinen konnten wir bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von IP-10 und MIG eine signifikante chemotaktische Aktivität für Th1-Zellen nachweisen, während Th2-Zellen nicht chemotaktisch reagierten. IP-10 wurde initial als chemotaktisch für aktivierte $CD4^+$ T-Zellen beschrieben (Taub et al., 1993b). Ähnlich dem Eotaxin war die Chemotaxis der Th1-Zellen geringer ausgeprägt als in der Literatur beschrieben. Auch hier könnten

unterschiedliche Aktivierungsstadien der untersuchten Zellen für die geringe Chemotaxis mitverantwortlich sein. So wurden in unseren Versuchen ruhende Effektorzellen und nicht voll aktivierte T-Lymphozyten verwendet.

IP-10 und MIG sind Liganden für CXCR-3, für den eine Expression auf IL-2-aktivierten T-Lymphozyten (Loetscher et al., 1996a) und präferentiell Th1-Zellen (Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1998) gezeigt werden konnte. Die Assoziation des Phänotyps „Th1“ mit der Expression von CXCR-3 wird auch durch *in vivo* Experimente unterstützt. So konnte eine verstärkte CXCR-3 Expression in lymphoiden Organen der IL-10 -/- Maus (Soto et al., 1998), welche eine chronische Colitis entwickelt, und auf praktisch allen T-Lymphozyten in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Athritis beobachtet werden (Qin et al., 1998). Beide Erkrankungen sind Beispiele für Th1-assoziierte Immunreaktionen.

Unsere Untersuchungen mittels RT-PCR zeigten allerdings nicht in allen Experimenten eine präferentielle Expression auf Th1-Zellen. Dieses variable Expressionsmuster konnte nicht nur bei den differenzierten Effektorzellen, sondern auch bei zwei Tage aktivierten Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis überrascht etwas angesichts der doch deutlichen Assoziation von CXCR-3 mit Th1-dominierten Immunreaktionen, doch zeigte auch die Studie von Annunziato et al. keine Präferenz in der Expression von CXCR-3 für eine der Subpopulationen (Annunziato et al., 1999). Andere Rezeptorstudien zeigten eine geringe Genexpression von CXCR-3 auf Th2-Zellen bei allerdings deutlicher Prädominanz für Th1-Zellen (Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1998) und eine Analyse humaner polarisierter Th1- und Th2-Zellinien mit monoklonalen Antikörpern zeigte eine dominante aber nicht ausschließliche Expression von CXCR-3 auf Th1-Zellen (Sallusto et al., 1999).

Schließlich: Da CXCR-3 auch auf IL-2-aktivierten, noch nicht polarisierten T-Zellen gefunden wurde, ist denkbar, daß sich in unserer Th2-Zellkultur bei Addition von IL-2 aktivierte, noch nicht polarisierte Zellen, sogenannte Th0-Zellen, befinden, welche CXCR-3 exprimieren (Sallusto et al., 1998), bzw. daß CXCR-3 erst im Verlauf einer längeren Polarisierung auf Th2-Zellen herunterreguliert wird.

Im Gegensatz zu vielen CC-Chemokinen, welche auch chemotaktisch für Monozyten, Basophile oder Eosinophile sind und als Ligand mehrere Rezeptoren erkennen, sind IP-10 und MIG sowohl selektiv chemotaktisch für aktivierte T-Lymphozyten als auch Ligand für nur einen Rezeptor: CXCR-3.

Die Produktion von IP-10 und MIG wird durch das von Th1-Zellen produzierte IFNγ induziert (Farber, 1997; Cole et al., 1998), das zusätzlich die Expression anderer Chemokine verhindert (Baggiolini et al., 1994). Die Selektivität von IP-10 und MIG für die Rekrutierung von T-Effektorzellen vom Th1-Typ zusammen mit der Produktion von IFNγ durch diese Th1-Zellen und dadurch einer weiteren Produktion von IP-10/MIG könnte für einen Th1-spezifischen positiven Feedback-Mechanismus sprechen. In dieses Modell passen auch die erst kürzlich beschriebene Antagonisierung von CCR-3 durch die CXCR-3-Liganden MIG und IP-10 (Loetscher et al., 2000) und die durch das Zytokin IFNα hervorgerufene Hochregulation von CXCR-3 und gleichzeitige Inhibition der Expression von CCR-3 und CCR-4 (Sallusto et al., 1998). So könnte die Th1-Immunantwort sowohl über ein positives Feedback direkt verstärkt als auch die Migration von Th2-Zellen durch eine Inhibition der Expression und Antagonisierung Th2-assoziierter Chemokinrezeptoren blockiert werden.

Dieses Modell zeigt, daß Zytokine, wie hier für IFNγ gezeigt, in einer spezifischen Immunreaktion sowohl die Proliferation und Differenzierung von Effektorzellen im Gewebe selbst (einschließlich Unterdrückung anderer Effektorzell-Phänotypen) als auch die Ausstattung der benötigten Effektorzellen mit distinkten selektiven Rezeptoren und die Induktion spezifischer Chemokine steuern, wobei die Chemokine wiederum durch weitere Migration Zytokin-produzierender Zellen und direkte Blockade nicht benötigter Effektorzellen die Polarisierung zusätzlich verstärken.

Als Vertreter der nicht in entzündlichem Gewebe vorkommenden Chemokine wurde SDF-1 getestet. Für dieses CXC-Chemokin wird eher eine Rolle in der Rezirkulation von Immunzellen vermutet. Grund ist eine in vielen Geweben zu findende konstitutive Expression, die unabhängig von inflammatorischen Stimuli ist. Als bisher einziges Chemokin ist es lebensnotwendig und Mäuse, welche SDF-1 oder den spezifischen Rezeptor CXCR-4 nicht exprimieren, zeigen eine stark reduzierte Myelopoiese, einen Ventrikel-Septum-Defekt neben anderen Organdefekten und sterben perinatal (Nagasawa et al., 1996; Ma et al., 1998). Für SDF-1 wurde eine starke Chemotaxis von naiven T-Lymphozyten, allerdings bei im Vergleich zu den meisten anderen Chemokinen hohen

Konzentrationen, beschrieben (Bleul et al., 1996). In Übereinstimmung damit konnte im Humansystem die Expression von CXCR-4 auf naiven T-Lymphozyten gefunden werden (Bleul et al., 1997).

In den durchgeführten Untersuchungen induzierte SDF-1 die höchste chemotaktische Migration aller getesteten Chemokine bei den differenzierten Effektorzellen. Hier reagierten Th2-Zellen sehr viel stärker als Th1-Zellen bei einer Konzentration von 1000 ng/ml, der einzigen getesteten Konzentration, die eine chemotaktische Wirkung zeigte. Beide Zellpopulationen zeigten bei Überstand der Zellinie MS-5 eine vergleichbare maximale Chemotaxis. Allerdings war nicht bekannt, wie hoch die Konzentration von SDF-1 im MS-5-Überstand war. Mögliche Erklärungen für die ähnliche, hohe Reaktivität von Th1- wie Th2-Zellen wären daher entweder erstens die Möglichkeit, daß die hohe Migrationsrate der Th2-Zellen schon ein Maximum, limitiert durch Art und Dauer des Assay, erreicht hat oder zweitens, daß zusätzlich durch die Zellinie sezernierte Faktoren selektiv auf Th1-Zellen wirken. Bestätigt werden diese Befunde einer bevorzugten Rolle für Th2-Zellen durch eine stärkere Expression von CXCR-4 auf diesen Zellen. Ähnlich wie für CXCR-3 wurden auch hier weiterführende Analysen mit T-Lymphozyten innerhalb der Aktivierungsphase und mit naiven $CD4^+$ T-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, daß auch während der Aktivierungsphase Zellen unter Th2-Konditionen im Gegensatz zu Th1-Bedingungen CXCR-4 exprimierten. Da sich die Zellen zu dem Zeitpunkt der Messung noch nicht ausdifferenziert und damit das Differenzierungsstadium „Th1“ oder „Th2“ erreicht haben, liegt die Vermutung nahe, daß eines der zugegebenen Zytokine einen direkten Effekt auf die Expression von CXCR-4 haben könnte. Diese Hypothese wird unterstützt durch Untersuchungen, die eine Hochregulierung von CXCR-4 durch IL-4 sowie den gegensätzlichen Effekt durch IFNγ zeigen, wobei die Expression von CXCR-4 auch auf anderen T-Zell-Subpopulationen als Th2-Zellen gefunden werden konnte (Annunziato et al., 1999). Untersuchungen an humanen T-Zellen, in denen polarisierte Th2-Klone CXCR-4 exprimierten, zeigten keine Expression dieses Rezeptors auf Th1-Klonen (Jourdan et al., 1998). Dabei scheint die präferentielle Expression kein stabiles und damit selektives Merkmal des Th2-Zelltyps zu sein, da sich die Expression in beiden Klonen durch Zugabe von IL-4 induzieren ließ. Somit könnte IL-4 eine wichtige Rolle in der Regulation von CXCR-4 zukommen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß IFNγ zwar die Expression von

CC-Chemokinrezeptoren, nicht jedoch von CXCR-4 auf Monozyten erhöht (Zella et al., 1998) und so möglicherweise die nur geringe Expression von CXCR-4 auf Th1-Zellen erklärt werden kann.

Die nur sehr schwache Expression von CXCR-4 auf Th1-Zellen korrelierte nicht mit der auch bei Th1-Zellen ausgeprägten Chemotaxis. Möglich wäre, daß eine geringe mRNA-Produktion bei vorhandener Expression des Rezeptors vorliegt. Da CXCR-4 auf ruhenden und naiven T-Lymphozyten exprimiert wird (Bleul et al., 1997), reicht hier möglicherweise eine gering vorhandene Zahl an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelle aus. Somit würden quantitative Unterschiede in der Expression des Rezeptors die quantitativen Unterschiede in der Zellantwort bedingen.

Chemokine wie MIP-1α, MCP-1 oder IP-10, die sogenannten inflammatorischen Chemokinen, zeigen eine erhöhte Expression in der Reaktion auf inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-1 und TNFα, werden von einer Vielzahl von Zellen und in verschiedenen Typen der Immunantwort, z.T. mit unterschiedlicher Kinetik produziert. Lymphoide Chemokine wie SDF-1, das in B-Zell-Follikeln produzierte BCA-1 oder SLC, welches von Stromazellen im Lymphknoten produziert wird, sind dagegen in homeostatischen immunologischen Funktionen wie der lymphozytären Zellmaturation und dem „homing“ sowie der Strukturierung und Organisation lymphoider Gewebe involviert.

Chemokine, welche während des inflammatorischen Prozesses produziert werden, beeinflussen in starkem Maße Art, Ausmaß und Dauer der Immunreaktion. So entsteht ein komplexes regulatorisches Netzwerk von Zell-Zytokin/Chemokin-Interaktionen, welches mitbestimmt und determiniert wird durch entweder Th1- oder Th2-dominierte Immunreaktionen (Sallusto et al., 2000).

Hierzu haben neuere Untersuchungen erste Hinweise geliefert. So induziert IFNγ die Chemokine IP-10, MIG und RANTES und wird hierin von IL-4 antagonisiert (Luster und Ravetch, 1987), während dieses zusammen mit IL-13 Eotaxin induziert, wiederum antagonisiert von IFNγ (Li et al., 1999). Andere Arbeiten zeigen eine Korrelation zwischen der Sekretion von MIP-1α und einem Th1-Phänotyp. So reguliert MIP-1α die Produktion von IFNγ (Karpus et al., 1997) herauf und die IL-4-Produktion herunter (Lukacs et al.,

1997). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, daß Th1-Zellen selber MIP-1α produzieren (Schrum et al., 1996). Dieses Konzept der Interaktion vieler Zelltypen, orchestriert durch die Wirkung von Zytokinen und Chemokinen, beginnt erst jetzt, sich klarer herauszubilden.

Dabei ist sowohl die Extravasation als auch die Migration von Zellen in bestimmte Kompartimente des Gewebes ein Chemokin-beeinflußter Vorgang: So zeigen Untersuchungen an CCR-7 und seinem Liganden SLC, daß dieser Rezeptor verantwortlich ist für den Arrest von Lymphozyten an postkapillären Venolen, dem HEV, und den nachfolgenden Austritt in das Gewebe. Endothelzellen des HEV produzieren SLC (Gunn et al., 1998), welches an der luminalen Oberfläche präsentiert wird. Naive Lymphozyten, welche CCR-7 exprimieren (Sallusto et al., 1998) und unter *in vitro*-Bedingungen durch SLC unter Flußbedingungen arretiert werden können (Campbell et al., 1998), könnten so in lymphoide Gewebe via HEV einwandern, interessanterweise im Unterschied zum Beispiel zu Neutrophilen. Diese exprimieren zwar auch L-Selektin und LFA-1, zwei Komponenten, die für den Eintritt in den Lymphknoten durch das HEV notwendig sind, jedoch nicht CCR-7, was auf differentielle Kodierungsmuster („entry codes“) für die Extravasation unterschiedlicher Zelltypen hinweist. Dieses Modell wurde durch sogenannte plt/plt-Mäuse bestätigt, welche SLC nicht produzieren können und in denen T-Zellen nicht in lymphoide Gewebe einwandern (Gunn et al., 1999).

Wandert nun ein naiver T-Lymphozyt in den Lymphknoten und wird dort Antigen-stimuliert, wird CXCR-5 hochreguliert, wodurch die Zelle sensitiv für das in B-Zell-Follikeln exprimierte Chemokin BLC wird (Flynn et al., 1998) und was es ihr dadurch ermöglichen könnte, mit korrespondierenden B-Zellen zu interagieren. Diese ersten Daten passen zu Beobachtungen, daß T- und B-Lymphozyten sich nach Antigen-Stimulation aus ihrer jeweiligen Lokalisation im Lymphknoten aufeinander zu bewegen (Garside et al., 1998). Die Vielzahl der Chemokinrezeptoren und Chemokine lassen vermuten, daß in der Immunreaktion das Zusammentreffen verschiedener Zelltypen zu verschiedenen Zeiten durch die Änderung der Expressionsdichte („switch“) der Chemokinrezeptoren reguliert wird. Dieses faszinierende Modell, dessen genauere Beschreibung erst jetzt beginnt, läßt die ungeheure Flexibilität in den Modulationsmöglichkeiten der Immunreaktion erahnen.

Wir konnten in dieser Arbeit die höhere chemotaktische Aktivität von Th1- als Th2-Zellen, induziert durch die inflammatorischen Chemokine MIP-1α, MIP-1β, RANTES und im geringeren Ausmaß JE/MCP-1, IP-10 und MIG zeigen. Parallel dazu konnten in dieser und anderen Arbeiten die präferentielle Expression von CCR-5 und auch CXCR-3 auf Th1-Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind Bausteine des oben beschriebenen Konzepts und zeigen einen neuen Mechanismus in der Regulation und Balance zwischen diesen beiden Subpopulationen. Diese Zusammenhänge weiter aufzuklären ist ein Hauptziel der derzeitigen Chemokinforschung und essentiell für nachfolgende therapeutische Ansätze.

Die Blockade von Chemokinen und ihren Rezeptoren könnte so für die Prävention der Einwanderung von Lymphozyten in das Zielgewebe, z.B. bei Autoimmunerkrankungen oder Allergien, in Sepsis und anderen Entzündungsreaktionen in der Zukunft eine erhebliche Bedeutung bekommen. Viele verschiedene Typen von Chemokin-Antagonisten sind in letzter Zeit produziert worden, von monoklonalen Antikörpern über modifizierte Chemokine bis zu Inhibitoren auf der Basis kleiner organischer Moleküle (Wu et al., 1997; Baggiolini und Moser, 1997). In ersten Versuchen erwies sich die Blockade einzelner Chemokine als überraschend effektiv in der Suppression von Entzündungsreaktionen (Strieter et al., 1996).

Somit ist zu hoffen und zu erwarten, daß die Kenntnis der so vielfältigen Wirkungsweise von Chemokinen, ihre Blockade und Verstärkung, in der Zukunft eine wichtige Rolle in der selektiven Beeinflussung des Immunsystems spielen wird.

5. Zusammenfassung

Die Rezirkulation und gezielte Migration von Immunzellen in inflammatorisches Gewebe ist Voraussetzung für eine spezifische Immunantwort. Dabei kommt Effektorzellen vom Th1- und Th2-Typ mit ihrer jeweiligen Zytokin-Produktion eine Schlüsselrolle zu, in der neben der direkten Aktivierung und Differenzierung am Ort der Entzündung die selektive Rekrutierung von Th1/Th2-Zellen einen möglichen Regulationsmechanismus darstellt, der durch spezifische Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren erfolgt. Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktivität von Th1/Th2-Zellen auf Chemokine sowie die Chemokinrezeptor-Expression dieser Zellen näher zu charakterisieren.

Dazu wurde die Migration *in vitro* generierter Th1- und Th2-Zellen auf verschiedene Chemokine in einem Chemotaxis-Assay untersucht. Hier zeigte sich, daß Th1- aber nicht Th2-Zellen selektiv chemotaktisch auf inflammatorische Chemokine wie MIP-1α, MIP-1β, RANTES und in geringerem Maß JE/MCP-1, IP-10 und MIG reagierten. Zusätzlich zeigten beide T-Zell-Subpopulationen eine deutliche chemotaktische Aktivität auf das ubiquitär exprimierte SDF-1, wobei Th2-Zellen stärker als Th1-Zellen migrierten. Diese Ergebnisse waren die ersten, die Unterschiede in der Chemotaxis von murinen Effektorzellen vom Th1- und Th2-Typ auf Chemokine zeigen konnten (Siveke und Hamann, 1998) und ähneln den mit humanen Zellen durchgeführten Studien.

Desweiteren wurde die Expression der bis zu diesem Zeitpunkt charakterisierten Chemokinrezeptoren untersucht, wobei zum Nachweis der Rezeptoren eine RT-PCR etabliert wurde. Passend zu den Chemotaxis-Ergebnissen zeigte sich eine präferentielle Expression von CCR-5, dem einzigen Rezeptor, der sowohl MIP-1α, MIP-1β und RANTES bindet, auf Th1-Zellen, während CXCR-4 stärker auf Th2-Zellen exprimiert war. CXCR-3, der Rezeptor für IP-10 und MIG, zeigte eine uneinheitliche Expression. Untersuchungen der Chemokinrezeptorexpression auf unstimulierten $CD4^+$ T-Zellen identifizierte CXCR-4 auf diesen Zellen.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die basale Migration von naiven $CD4^+$ T-Zellen sowie von aktivierten und ruhenden Effektorzellen vom Th1- und Th2-Typ verglichen. Hierbei zeigte sich, daß ruhende Effektorzellen, und hier Th2-Zellen, den migratorisch aktivsten Zelltyp darstellten, wobei die Bedeutung dieser Ergebnisse und mögliche Funktion derzeit

noch unklar ist und weitere, die Migrationseigenschaften der Zellen beeinflußende, Faktoren noch zu identifizieren sind.

In dieser Arbeit konnten Unterschiede in der Chemokin-induzierten Chemotaxis und der Expression von Chemokinrezeptoren zwischen Th1- und Th2-Effektorzellen gezeigt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren zur gezielten Rekrutierung und Akkumulierung dieser Zellen beiträgt und damit den Charakter der Immunantwort beeinflußt. Obwohl noch viele Unklarheiten etwa bezüglich der Expressionsstabilität und des Einflußes von Zytokinen auf die Chemokinrezeptorexpression bestehen, eröffnet ein besseres Verständnis dieser Regulationsmechanismen vielversprechende Möglichkeiten zur Entwicklung therapeutischer Prinzipien, die selektiv modulierend in das Immunsystem eingreifen können.

6. Literatur

Abbas, A. K., Murphy, K. M., Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 383: 787-793.

Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., Bacon, K. B., Figdor, C. G. (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. Nature 387: 713-717.

Annunziato, F., Cosmi, L., Galli, G., Beltrame, C., Romagnani, P., Manetti, R., Romagnani, S., Maggi, E. (1999). Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. J Leukoc Biol 65: 691-9.

Assenmacher, M., Schmitz, J. a., Radbruch, A. (1994). Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes:
expression of interleukin-10 in interferon-y and in interleukin-4-expressing cells. Eur.J.Immunol. 24: 1097-1101.

Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Löhning, M., Bräuer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., Hamann, A. (1997). P-and E-selectin mediate recruitment of T helper 1 but not T helper 2 cells into inflamed tissues. Nature 385: 81-83.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. Adv Immunol 55: 97-179.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997). Human chemokines: An update. Ann. Rev. Immunol. 15: 675-705.

Baggiolini, M., Moser, B. (1997). Blocking chemokine receptors. J. Exp. Med. 186: 1189-1191.

Berlin, C., Campbell, J. J., von-Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Berg, E. L., Erlandsen, S. L., Butcher, E. C. (1995). Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. Cell 80: 413-422.

Bernardini, G., Hedrick, J., Sozzani, S., Luini, W., Spinetti, G., Weiss, M., Menon, S., Zlotnik, A., Mantovani, A., Santoni, A., Napolitano, M. (1998). Identification of the CC chemokines TARC and macrophage inflammatory protein-1 beta as novel functional ligands for the CCR8 receptor. Eur J Immunol 28: 582-8.

Bevilacqua, M. P. (1993). Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annu Rev Immunol. 11: 767-804.

Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., Springer, T. A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) [see comments]. J Exp Med 184: 1101-1109.

Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes [see comments]. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 1925-1930.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J Exp Med 187: 129-34.

Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo, I. F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature 394: 894-7.

Boyden, S. R. J. (1962). The chemotactic effects of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med 115: 453-466.

Bozic, C. R., Kolakowski, L. F., Jr., Gerard, N. P., Garcia Rodriguez, C., von Uexkull Guldenband, C., Conklyn, M. J., Breslow, R., Showell, H. J., Gerard, C. (1995). Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. J Immunol 154: 6048-6057.

Butcher, E. C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. Cell 67: 1033-1036.

Butcher, E. C., Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. Science 272: 60-6.

Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. Science 279: 381-4.

Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S., Springer, T. A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 3652-3656.

Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., Sahagan, B. G., Neote, K. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non- ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. J Exp Med 187: 2009-21.

Cook, D. N., Beck, M. A., Coffman, T. M., Kirby, S. L., Sheridan, J. F., Pragnell, I. B., Smithies, O. (1995). Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. Science 269: 1583-1585.

Dustin, M. L. (1998). Making a little affinity go a long way: a topological view of LFA-1 regulation. Cell Adhes Commun 6: 255-62.

Farber, J. M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. J Leukoc Biol 61: 246-57.

Fawcett, J., Holness, C. L., Needham, L. A., Turley, H., Gatter, K. C., Mason, D. Y., Simmons, D. L. (1992). Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. Nature 360: 481-4.

Flynn, S., Toellner, K. M., Raykundalia, C., Goodall, M., Lane, P. (1998). CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. J Exp Med 188: 297-304.

Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. Cell 87: 1037-1047.

Gallatin, W. M., Weissman, I. L., Butcher, E. C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. Nature 304: 30-34.

Gao, J. L., Murphy, P. M. (1995). Cloning and differential tissue-specific expression of three mouse beta chemokine receptor-like genes, including the gene for a functional macrophage inflammatory protein-1 alpha receptor. J Biol Chem 270: 17494-501.

Garlisi, C. G., Xiao, H., Tian, F., Hedrick, J. A., Billah, M. M., Egan, R. W., Umland, S. P. (1999). The assignment of chemokine-chemokine receptor pairs: TARC and MIP-1 beta are not ligands for human CC-chemokine receptor 8. Eur J Immunol 29: 3210-5.

Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J., Jenkins, M. K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. Science 281: 96-9.

Gross, J. A., Callas, E., Allison, J. P. (1992). Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. J Immunol 149: 380-388.

Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., Nakano, H. (1999). Mice Lacking Expression of Secondary Lymphoid Organ Chemokine Have Defects in Lymphocyte Homing and Dendritic Cell Localization. J Exp Med 189: 451-460.

Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., Williams, L. T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 258-63.

Heesen, M., Berman, M. A., Hopken, U. E., Gerard, N. P., Dorf, M. E. (1997). Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor- 4 isoforms. J Immunol 158: 3561-4.

Hieshima, K., Imai, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O., Nomiyama, H. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. J Biol Chem 272: 5846-5853.

Holzmann, B., Weissman, I. L. (1989). Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptors consist of a VLA-4-like alpha chain associated with either of two integrin beta chains, one of which is novel. EMBO J. 8: 1735-41.

Horuk, R. (1999). Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. Immunol Today 20: 89-94.

Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Yoshie, O. (1997). The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. J Biol Chem 272: 15036-42.

Imai, T., Chantry, D., Raport, C. J., Wood, C. L., Nishimura, M., Godiska, R., Yoshie, O., Gray, P. W. (1998). Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. J Biol Chem 273: 1764-8.

Jones, D. A., McIntire, L. V., Smith, C. W., Picker, L. J. (1994). A two-step adhesion cascade for T cell/endothelial cell interactions under flow conditions. J. Clin. Invest. 94: 2443-50.

Jourdan, P., Abbal, C., Nora, N., Hori, T., Uchiyama, T., Vendrell, J.-P., Bousquet, J., Taylor, N., Pene, J., Yssel, H. (1998). Cutting Edge: IL-4 Induces Functional Cell-Surface Expression of CXCR4 on Human T Cells. J. Immunol. 160: 4153-4157.

Karpus, W. J., Lukacs, N. W., Kennedy, K. J., Smith, W. S., Hurst, S. D., Barrett, T. A. (1997). Differential CC Chemokine-Induced Enhancement of T Helper Cell Cytokine Produktion. J. Immunol. 158: 4129-4136.

Kurihara, T., Bravo, R. (1996). Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC. J Biol Chem 271: 11603-11607.

Lasky, L. A., Singer, M. S., Yednock, T. A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen, T., Stachel, S., Rosen, S. D. (1989). Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. Cell 56: 1045-1055.

Ledbetter, J. A., Herzenberg, L. A. (1979). Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunol. Rev. 47: 63-90.

Leo, O., Foo, M., Sachs, D. H., Samelson, L. E., Bluestone, J. A. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1374-1378.

Lewinsohn, D. M., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. (1987). Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. J. Immunol. 138: 4313-21.

Li, L., Xia, Y., Nguyen, A., Lai, Y. H., Feng, L., Mosmann, T. R., Lo, D. (1999). Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. J Immunol 162: 2477-87.

Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1996a). Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes [see comments]. J Exp Med 184: 963-9.

Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M., Moser, B. (1996b). Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes [see comments]. J Exp Med 184: 569-77.

Loetscher, P., Seitz, M., Clark Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1994). Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. Faseb J 8: 1055-1060.

Loetscher, P., Uguccioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes [letter]. Nature 391: 344-5.

Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J. H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. (2000). The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig and IP10, are natural antagonists for CCR3. J Biol Chem 2000 Nov10 [epub ahead of print]

Lukacs, N. W., Chensue, S. W., Karpus, W. J., Lincoln, P., Keefer, C., Strieter, R. M., Kunkel, S. L. (1997). C-C Chemokines Differentially Alter Interleukin-4 Production from Lymphocytes. Am. J. Pathol. 150: 1861-1868.

Luster, A. D., Ravetch, J. V. (1987). Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. Mol Cell Biol 7: 3723-31.

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 9448-53.

McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. J. Clin.. Invest.. 84: 92-99.

Meyer, A., Coyle, A. J., Proudfoot, A. E., Wells, T. N., Power, C. A. (1996). Cloning and characterization of a novel murine macrophage inflammatory protein-1alpha receptor. J Biol Chem 271: 14445-14451.

Möhle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M. A., Brugger, W., Kanz, L. (1998). The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. Blood 91: 4523-30.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffmann, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clones I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136: 2348-2357.

Mosmann, T. R., Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol. Today 17: 138-146.

Muprhy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Herbert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., Power, C. A. (2000). International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. Pharmacological Reviews 52: 145-76.

Murphy, W. J., Tian, Z. G., Asai, O., Funakoshi, S., Rotter, P., Henry, M., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Longo, D. L., Taub, D. D. (1996). Chemokines and T lymphocyte activation: II. Facilitation of human T cell trafficking in severe combined immunodeficiency mice. J Immunol 156: 2104-2111.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature 382: 635-8.

Oppenheim, J. J., Wang, J. M., Chertov, O., Taub, D. D., Ben-Baruch, A. (1996). The role of chemokines in transplantation. Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects. Tilney, N. L., Strom, T. B., al., e., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA: pg. 21.1.

Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O., Mukaida, N., Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. Ann Rev Immunol 9: 617-48.

Pietschmann, P., Cush, J. J., Lipsky, P. E., Oppenheimer, M. N. (1992). Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. J. Immunol. 149: 1170-1178.

Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B., Mackay, C. R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. J Clin Invest 101: 746-54.

Rabin, R. L., Park, M. K., Liao, F., Swofford, R., Stephany, D., Farber, J. M. (1999). Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. J Immunol 162: 3840-3850.

Reue, K. (1998). mRNA Quantitation Techniques: Considerations for Experimental Design and Application. J Nutr 128: 2038-2044.

Röhnelt, R. K., Hoch, G., Reiß, Y., Engelhardt, B. (1997). Immunosurveillance modelled *in vitro*: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium. International Immunology 9: 435-450.

Roth, S. J., Carr, M. W., Springer, T. A. (1995). C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. Eur J Immunol 25: 3482-3488.

Sako, D., Chang, X. J., Barone, K. M., Vachino, G., White, H. M., Shaw, G., G.M., Veldman, Bean, K. M., Ahern, T. J., Furie, B., Cumming, D. A., Larsen, G. R. (1993). Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. Cell 75: 1179-1186.

Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999). Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. Eur J Immunol 29: 2037-45.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J. Exp. Med. 187: 875-883.

Sallusto, F., Mackay, C. R., Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. Science 277: 2005-2007.

Sallusto, F., Mackay, C. R., Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. Annu Rev Immunol 18: 593-620.

Schall, T. J., Bacon, K., Camp, R. D., Kaspari, J. W., Goeddel, D. V. (1993). Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. J. Exp. Med. 177: 1821-1826.

Schrum, S., Probst, P., Fleischer, B., Zipfel, P. F. (1996). Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. J. Immunol. 157: 3598-3604.

Schwarz, M. K., Wells, T. N. (1999). Interfering with chemokine networks--the hope for new therapeutics. Curr Opin Chem Biol 3: 407-17.

Siveke, J., Hamann, A. (1998). Cutting edge: Th1 and Th2 cells respond differentially to chemokines. J.Immunol. 160: 550-554.

Soto, H., Wang, W., Strieter, R. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Hedrick, J., Zlotnik, A. (1998). The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 8205-10.

Springer, T. A. (1980). Cell-surface differentiation in the mouse. Monoclonal antibodies. Kennett, R. H., McKearn, T. J., Bechtol, K. B. New York, London, Plenum Press: 186-217.

Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 76: 301-14.

Strieter, R. M., Standiford, T. J., Huffnagle, G. B., Colletti, L. M., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L. (1996). "The good, the bad and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. J. Immunol. 156: 3583-6.

Syrbe, U., Siveke, J., Hamann, A. (1999). Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? Springer Semin Immunopathol 21: 263-285.

Tamaru, M., Tominaga, Y., Yatsunami, K., Narumi, S. (1998). Cloning of the Murine Interferon-Inducible Protein 10 (IP-10) Receptor and Its Specific Expression in Lymphoid Organs. Biochem Biophys Res Commun 251: 41-48.

Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta [see comments]. Nature 361: 79-82.

Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J., Kelvin, D. J. (1993a). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. Science 260: 355-358.

Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J., Oppenheim, J. J. (1993b). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. J. Exp. Med. 177: 1809-14.

Taub, D. D., Longo, D. L., Murphy, W. J. (1996). Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice. Blood 87: 1423-1431.

Unkeless, J. (1979). Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. J. Exp. Med. 150: 580-595.

Wu, L., Paxton, W. A., Kassam, N., Ruffing, N., Rottman, J. B., Sullivan, N., Choe, H., Sodroski, J., Newman, W., Koup, R. A., Mackay, C. R. (1997). CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. J. Exp. Med. 185: 1681-91.

Zella, D., Barabitskaja, O., Burns, J. M., Romerio, F., Dunn, D. E., Revello, M. G., Gerna, G., Reitz, M. S., Jr., Gallo, R. C., Weichold, F. F. (1998). Interferon-gamma increases expression of chemokine receptors CCR1, CCR3, and CCR5, but not CXCR4 in monocytoid U937 cells. Blood 91: 4444-50.

Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000). Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. Immunity 12: 121-127.

Zubler, R. H., Lowenthal, Z. W., Erard, F. R., Hashimoto, N., Reros, R., MacDonald, H. R. (1984). Activate B-cells express receptors for, and proliferate in response to, pure IL2. J. Exp. Med. 160: 1170-1183.

Veröffentlichungen:

Siveke, J. T. and A. Hamann (1998). Cutting Edge: T Helper 1 and T Helper 2 Cells respond differentially to chemokines. J. Immunol. 160: 550-554

Syrbe, U., **J. Siveke** and A. Hamann (1999). Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? Springer Semin Immunopathol 21(3): 263-85

Kongressbeiträge:

Siveke, J., Syrbe, U. and A. Hamann. Chemokine receptors and chemotactic reactivity of murine Th1 and Th2 cells. Workshop über Th1/Th2-Zellforschung, Juli 1999, Erlangen.

Siveke, J. und A. Hamann. Differential responsiveness of T-effector cell subsets towards chemokines. Cell Adhesion and Migration in Inflammation and Cancer, 2nd Amsterdam "Zoo" Meeting, Oktober 1997, Amsterdam

Hamann, A. and F. Austrup, **J. Siveke**, W. Tietz, Y. Allemand, D. Vestweber, U. Herz, R. Bräuer. Trafficking of T effector cells: properties and mechanisms. Cell Adhesion and Migration in Inflammation and Cancer, 2nd Amsterdam "Zoo" Meeting, Oktober 1997, Amsterdam

Siveke, J. und A. Hamann. Differential responsiveness of T-effector cell subsets towards chemokines. Workshop: Immunologie und Biochemie von Zytokinen in Entzündung, Allergie und Autoimmunität, Mai 1997, Borstel

Lebenslauf

Name:	Jens Thomas Siveke
Geburtsdatum:	08.05.1973
Geburtsort:	Hamburg

Ausbildung:

1992	Abitur am Friedrichs-Gymnasium in Herford
1989 - 1990	Teilnahme am AFS-Programm als Gastschüler an der Tennessee High School in Bristol, TN (USA)
1992 - 1994	Zivildienst in der Notaufnahme des AK Eilbek, Hamburg
1994 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1996 - 1998	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Hamann in der Abteilung für Immunologie, 1. Med. Klinik, Universitätsklinikum Eppendorf
1999 – 2000	DAAD-Stipendiat bei Prof. Dr. B. Ardman im Dep. of Hematology/Oncology des New England Medical Center in Boston, MA (USA)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Prof. Dr. Alf Hamann für die Überlassung des Themas und seine dauerhafte und in allen Belangen so hilfreiche Betreuung und Unterstützung bedanken.

Bei Prof. Dr. R. A. K. Stahl und den Mitgliedern seiner Abteilung möchte ich mich für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie für die hilfreichen Anregungen bedanken.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Hamann, insbesondere Y. Allemand, Dr. F. Austrup, D. Jablonski-Westrich, Dr. P. Jonas, J. Lehmann, Dr. I. Stahmer und Dr. W. Tietz für ihre Hilfsbereitschaft und anregenden Diskussionen in den vergangenen Jahren.

Ich möchte mich auch bei PD Dr. B. Engelhardt und Dr. Y. Reiss für ihre Anregungen zum Chemotaxis-Assay und die Durchführung von transendothelialen Migrations-Assays, bei Dr. P. Friedl für die Hilfe bei der Durchführung von Chemotaxis-Assays in einer 3D-Matrix und bei S. Rothenburg für die Anregungen zur RT-PCR bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei allen MitarbeiterInnen der Abteilung für Immunologie am UKE für die ausgesprochen schöne Zeit im Labor.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.