

Die Funktion des Chemokinrezeptors CXCR6 in der
T-Zellantwort der Maus gegen
Listeria monocytogenes

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kira Heesch
aus Rendsburg

Hamburg, 2013

Errstgutachter: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Immunologie

Zweitguachterin: Prof. Dr. Iris Bruchhaus
Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin
Molekulare Parasitologie

Betreuer: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Immunologie

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. H.-W. MITTRÜCKER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Professor Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 11. Oktober 2013

Hamburg, den 26. September 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des 3
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iv
Abstract	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
Danksagung	ix
1 Einleitung	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1.1 Die Infektion durch <i>Listeria monocytogenes</i>	2
1.1.2 Die Immunantwort gegen <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.1.3 Der Verlauf der Listerien-Infektion im Mausmodell	5
1.2 CD8 ⁺ T-Zellen	5
1.2.1 Die CD8 ⁺ T-Zellantwort	6
1.2.2 Die CD8 ⁺ T-Zelldifferenzierung	7
1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren	8
1.3.1 Chemokine	8
1.3.2 Chemokinrezeptoren	10
1.3.3 Der Chemokinrezeptor CXCR6 und sein Ligand CXCL16	12
2 Zielsetzung	14
3 Materialien	15
3.1 Chemikalien und Reagenzien	15
3.2 Puffer und Lösungen	16
3.3 Stimulationssubstanzen	17
3.4 Medien und Medienzusätze	17
3.5 Fluoreszenz-markierte Materialien	17
3.5.1 Antikörper	17
3.5.2 Lebend/Tot Farbstoffe	18
3.5.3 Reagenzien zur Proliferations- und Apoptosebestimmung	19
3.6 Sonstige Materialien	19
3.7 Mauslinien	19
3.8 Bakterienstämme	20

3.9	Geräte	20
3.10	Software	21
4	Methoden	22
4.1	Infektion von Mäusen	22
4.2	Transfer von OT-I Zellen in die Maus	22
4.3	Reinigung von Lymphozyten aus Organen der Maus	23
4.3.1	Aufarbeitung von Lymphozyten aus der Milz	23
4.3.2	Aufarbeitung von Lymphozyten aus der Leber	24
4.3.3	Aufarbeitung von Lymphozyten aus dem Lymphknoten	24
4.3.4	Aufarbeitung von Lymphozyten aus der Lunge	24
4.3.5	Aufarbeitung von Lymphozyten aus dem Knochenmark	25
4.3.6	Aufarbeitung von Lymphozyten aus dem Blut	25
4.4	Zellzahlbestimmung	25
4.5	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)	26
4.6	Stimulation von T-Zellen	27
4.6.1	<i>In vitro</i> Stimulation	27
4.6.2	CXCL16 Stimulation	28
4.7	FACS (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)-Färbung	28
4.7.1	Extrazelluläre FACS-Färbung	28
4.7.2	Intrazelluläre FACS-Färbung	29
4.8	Proliferationsbestimmung	29
4.8.1	Zell-Proliferationsfarbstoff eFluor 670	29
4.8.2	Ki-67	30
4.8.3	Bromdesoxyuridin (BrdU)	30
4.9	Apoptosebestimmung	30
4.9.1	Annexin V	31
4.9.2	Fluoreszenz markierte Inhibitoren von Caspasen (FLICA)	31
4.10	FACS-Messung	31
4.10.1	Durchflusszytometrie	31
4.10.2	FACS-Messung und Auswertung der FACS-Ergebnisse	31
4.11	Statistik	33
5	Ergebnisse	34
5.1	Expression des Chemokinrezeptors CXCR6	34
5.1.1	Expression von CXCR6 auf CD8 ⁺ T-Zellen	34
5.1.2	Expression von CXCR6 auf aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen	36
5.1.3	Expression von CXCR6 auf Listerien-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	37
5.2	Bakterienbelastung in CXCR6 ^{GFP/GFP} Mäusen	40

5.3	T-Zellantworten von CXCR6 ^{GFP/GFP} Mäusen	41
5.3.1	Vergleich der primären T-Zellantworten	41
5.3.2	Vergleich der sekundären T-Zellantworten	45
5.4	Migration und Verteilung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	48
5.4.1	Vergleich der Migration und Verteilung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	49
5.4.2	Vergleich der Aktivierung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	50
5.5	Überleben von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	53
5.5.1	Vergleich der Verteilung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	53
5.5.2	Vergleich der Apoptose von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	54
5.5.3	Vergleich der Proliferation von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	57
5.5.4	Vergleich der Erschöpfung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	59
5.5.5	Vergleich der Zytokin-Produktion von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	60
5.5.6	Vergleich der Aktivierung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer	62
5.6	Überleben und Proliferation von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	64
6	Diskussion	71
6.1	Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6	71
6.2	Die Relevanz von CXCR6 für die Immunantwort gegen <i>Listeria monocytogenes</i> . .	73
6.3	Migration und Verteilung von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8 ⁺ T-Zellen .	74
6.4	Überleben von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8 ⁺ T-Zellen	76

Zusammenfassung

Die Leber ist neben der Milz das wichtigste Zielorgan von *Listeria monocytogenes*. Im Rahmen der Immunantwort findet eine Akkumulation von T-Zellen in den infizierten Organen statt. Für die Kontrolle der Listerieninfektion sind aufgrund der intrazellulären Lebensweise des Bakteriums T-Zellen, vor allem CD8⁺ T-Zellen, entscheidend. Da in der Leber keine T-Zellantworten generiert werden können, muss die T-Zellakkumulation auf der Rekrutierung von Effektor-T-Zellen, die in Lymphgeweben gebildet wurden, beruhen. Im *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell sind die Mechanismen der T-Zellmigration nur unzureichend bekannt. Für die Beteiligung von Chemokinen und deren Rezeptoren gibt es nur wenige und zum Teil widersprüchliche Studien. Unveröffentlichte mRNA-Expressionsanalysen ergaben, dass *Listeria monocytogenes* spezifische CD8⁺ T-Zellen unter anderem relativ hohe Level für den Chemokinrezeptor CXCR6 zeigten. Weiterhin findet sich der CXCR6-Ligand CXCL16 in sinusoidalen Endothelien der Leber. Aufgrund dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass CXCR6 die Aktivierung, die Differenzierung und die Migration von CD8⁺ T-Zellen während der Immunantwort der Maus gegen *Listeria monocytogenes* reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in der Maus ein großer Anteil an CD8⁺ T-Zellen in der Leber CXCR6-positiv war und dieser Anteil während der Infektion mit *Listeria monocytogenes* noch weiter anstieg. Listerien-spezifische CD8⁺ T-Zellen erwarben CXCR6 auf ihrer Oberfläche, im Verhältnis zur Zytokinexpression war die CXCR6-Expression jedoch verzögert. CXCR6-defiziente Mäuse konnten jedoch normale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten ausbilden und zeigten eine vergleichbare Akkumulation dieser Zellen in der Leber. Die CXCR6-Defizienz führte auch zu keinem Nachteil in der Kontrolle der Listerieninfektion. Im T-Zelltransfer war die Akkumulation Listerien-spezifischer aktivierter CD8⁺ T-Zellen in der Leber zu frühen Zeitpunkten von der Expression von CXCR6 abhängig. Während des Maximums der T-Zellantwort konnte das Fehlen von CXCR6 jedoch durch andere Mechanismen ausgeglichen werden. Bei der Beobachtung von transferierten CD8⁺ T-Zellen über einen längeren Zeitraum konnte schließlich gezeigt werden, dass CXCR6 zu späten Zeitpunkten nach der Infektion wichtig für das Überleben, die Proliferation und die Gewebeverteilung von CD8⁺ T-Zellen war.

Zusammenfassend steuert CXCR6 zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit *Listeria monocytogenes* die Migration von Listerien-spezifischen aktivierten CD8⁺ T-Zellen in die Leber und ist zu späten Zeitpunkten nach der Infektion wichtig für das Überleben von CD8⁺ T-Zellen.

Abstract

Spleen and liver are the main target organs of *Listeria monocytogenes*. Due to the intracellular lifecycle of *Listeria monocytogenes*, CD8⁺ T cells are crucial for the control of infection. For an efficient immune response, an accumulation of these T cells in infected organs is essential. Since T-cell responses are not primed in the liver, the T-cell accumulation in this organ depends on the recruitment of T effector cells generated in secondary lymphoid organs. The mechanisms of T-cell migration in the *Listeria monocytogenes* infection model are not well understood and the involvement of chemokines and their receptors is discussed contradictorily. Unpublished mRNA expression analyses from our group have shown that CD8⁺ T cells specific for *Listeria monocytogenes* express high mRNA levels for the chemokine receptor CXCR6. Furthermore, the ligand for CXCR6, the chemokine CXCL16, is expressed on the sinusoidal endothelium of the liver. Because of these data, we hypothesized that CXCR6 regulates activation, differentiation, and migration of CD8⁺ T cells during immune responses of mice against *Listeria monocytogenes*. In this thesis we demonstrate that a high proportion of CD8⁺ T cells in livers of mice were CXCR6-positive and that this fraction further rose during infection with *Listeria monocytogenes*. CD8⁺ T cells specific for listeria acquired CXCR6 on their surface, but the expression of CXCR6 was delayed compared with the expression of cytokines. However, CXCR6-deficient mice could generate normal CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses and these cells showed comparable accumulation in the infected liver. CXCR6-deficiency also did not impair control of listeria. In T-cell transfer assays, accumulation of listeria-specific activated CD8⁺ T cells was dependent on CXCR6 at early time points post-infection. At later time points, the absence of CXCR6 was compensated by other mechanisms. By following transferred CD8⁺ T cells for prolonged time periods, we could finally demonstrate that CXCR6 was important for long-term survival, proliferation and tissue distribution of CD8⁺ T cells.

In conclusion, we provide evidence that CXCR6 regulates the migration of activated listeria-specific CD8⁺ T cells to the liver at early time points of infection. On the other hand CXCR6 is also important for the long-term survival of CD8⁺ T cells.

Abkürzungsverzeichnis

ActA	<i>actin-assembly-inducing protein</i>
ADAM	<i>A Disintegrin and metalloprotease domain-containing protein</i>
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrom</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AP-1	<i>activator protein-1</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BFA	Brefeldin A
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
Da	Dalton
Dapi	<i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FLICA	<i>fluorescence labeled inhibitor of caspases</i>
fM	N-formyl Methionin
FSC	Forward Scatter
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GvH	<i>graft-versus-host</i>
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
InlA	Internalin A
InlB	Internalin B
Iono	<i>Ionomycin</i>
ip	intraperitoneal
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>

iv	intravenös
KLRG1	<i>killer lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
LAG-3	<i>lymphocyte activation gene 3</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
Ldlr	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LLO	Listeriolysin O
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MACS	<i>magnetic-associated cell sorting</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
Mpl	Zink-Metalloprotease
n	Anzahl
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF \times B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>nonobese diabetic</i>
NOR	<i>nonobese resitant</i>
NRS	Natives Rattenserum
PBS	<i>phospate buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed death 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	<i>post infection</i>
PMA	<i>phorbol 12-wyrystate 13-acetate</i>
RAG	recombination activation gene
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
SR-PSOX	<i>scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipids</i>
SSC	Side Scatter
STRL33	<i>seven transmembrane receptor-like from clone 33</i>
SZ	Spenderzellen
TAP	<i>transproter associated with antigen processing</i>
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	<i>12-O-Tetradecanyphorbol-13-acetate</i>

TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TYMSTR	<i>T lymphocyte-expressed seven-transmembrane domain receptor</i>
TZR	<i>T-Zellrezeptor</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion protein 1</i>
wt	<i>Wildtyp</i>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Immunologie anfertigen zu können. Ich danke ihm für die außergewöhnlich gute Betreuung, für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und für das Korrekturlesen meiner Dissertation. Er unterstützte mich durch ständige Diskussionsbereitschaft und hatte viele Anregungen zu den durchgeführten Experimenten.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen vom Institut für Immunologie und besonders bei den Mitgliedern der AG Mittrücker für das gute Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und natürlich für die tolle Zeit am Institut.

Insbesondere danke ich Valéa für die Einarbeitung, die praktische Hilfe und für viele gute Gespräche.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Ulf Panzer für die Bereitstellung der CXCR6-defizienten Mäusen bedanken und danke den Mitgliedern meiner Betreuungs-Kommission Frau Prof. Dr. Gisa Tiegs und PD Dr. Thomas Jakobs, die mir im Rahmen des Graduiertenkollegs "Entzündung und Regeneration" im SFB 841 mit hilfreichen Diskussionen weiter geholfen haben.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Friederike bedanken. Sie hat mir bei der Durchführung vieler Experimente geholfen, stand mir mit Rat und Tat zur Seite und ist zu einer richtigen Freundin geworden. Danke!

Meinen Eltern danke ich für ihre uneingeschränkte Hilfe während des Studiums und der Doktorarbeit, ihre bedingungslose Unterstützung und den grenzenlosen Glauben an ihre Tochter.

Zu guter Letzt und im Besonderen möchte ich mich bei meinem Verlobten Torsten und meiner Schwester Kerrin für die ständige Unterstützung und den unermüdlichen Glauben an mich bedanken. Sie stehen immer an meiner Seite und ermöglichen mir meine Ziele zu erreichen.

1 Einleitung

Die primäre Aufgabe des Immunsystems besteht darin, zwischen "Eigen" und "Fremd" zu unterscheiden und den Körper so gegen Infektionen durch Pathogene, wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten zu schützen. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem. Die erste Abwehr von Pathogenen erfolgt durch humorale und zelluläre Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Pathogene mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren, die gegen hoch konservierte mikrobielle Bestandteile gerichtet sind. Zellen der erworbenen Immunantwort generieren durch Rekombination von Gensegmenten eine außerordentliche Vielzahl von Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität. Bei Erkennung eines Pathogens durch eine T-Zelle oder B-Zelle mit passendem T-Zellrezeptor (TZR) bzw. Antikörper, werden diese Zellen aktiviert und proliferieren, so dass eine große Anzahl an Zellen mit Pathogen-spezifischen Rezeptoren entsteht, die dann eine effektive Kontrolle des Pathogens gewährleisten. Einige Pathogene umgehen eine Erkennung durch das Immunsystem indem sie sich intrazellulär vermehren. Beispiele hierfür sind Viren, aber auch bestimmte Bakterien und Protozoen verwenden diese Strategie. Für die Kontrolle dieser Pathogene sind CD8⁺ T-Zellen wichtig. Sie können infizierte Zellen erkennen und töten. So wird beispielsweise die Vermehrung von Viren verhindert. Andere Pathogene werden durch die Zelltötung freigesetzt und dadurch für Phagozyten zugänglich. Ein Beispiel für ein Bakterium, das sich intrazellulär vermehren kann und durch CD8⁺ T-Zellen kontrolliert wird, ist *Listeria monocytogenes*. Die Infektion von Mäusen mit diesem Bakterium stellt daher ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung der CD8⁺ T-Zellantwort dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR6 für die CD8⁺ T-Zellantwort im *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell untersucht.

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (*Lm*) ist ein stäbchenförmiges, Gram-positives Bakterium mit ubiquitärer Verbreitung in der Natur. Es lebt fakultativ anaerob und saprophytisch und kann Säugetiere infizieren. Bei Ziegen, Schafen und Rindern führt die Infektion mit Listerien zu zentralnervösen Erkrankungen und Fehlgeburten. Bei gesunden Menschen können Infektionen mit sehr hohen Dosen ebenfalls ernsthafte Erkrankungen mit schweren Komplikationen durch eine Enzephalitis verursachen. Zu den Risikogruppen gehören neben immunsupprimierten Menschen auch

schwängere Frauen. Eine Listerieninfektion bei immunsupprimierten Menschen kann schwere Krankheitsbilder, wie Sepsis und Meningitis, mit zum Teil lebensbedrohlichen Verläufen hervorrufen. Da *Lm* plazentagängig ist, kann die Infektion einer schwangeren Frau zum septischen Abort des Fötus, zu Totgeburten und bei noch geborenen Kindern zu *Listeriosis infantiseptica* führen. Infektionen vor der Geburt oder während des Geburtsvorgangs bewirken Sepsis, Meningitis und Pneumonie des Kindes. Das breite Wirtsspektrum von *Lm* erlaubt auch die Infektion von Mäusen. Die Maus wird daher seit mehreren Jahrzehnten als Infektionsmodell genutzt und es liegen sehr umfangreiche Daten zum Verlauf der Infektion und zur Immunantwort gegen Listerien in der Maus vor [1, 2, 3].

1.1.1 Die Infektion durch *Listeria monocytogenes*

Die Ansteckung mit Listerien erfolgt meist über mit Staub oder Erde kontaminierte Lebensmittel und Futtermittel. Wiederkäuer infizieren sich häufig über Silage mit zu hohem pH-Wert, da hier nur eine unzureichende Vergärung stattfindet. Mit dem Keim kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs, wie Rohmilch und Käse, sind beim Menschen häufige Ursache für eine Listerieninfektion. Eine direkte Übertragung zwischen infizierten Personen oder Tieren ist ungewöhnlich. Die primären Zielorgane von Listerien im Wirt sind nach dem Verlassen des Magen-Darmtrakts vor allem Milz und Leber [1, 2].

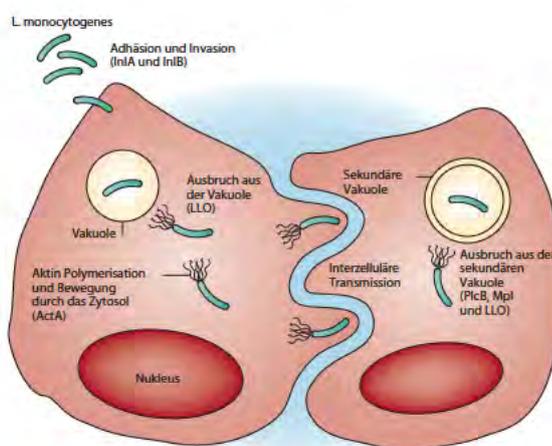


Abbildung 1.1: Lebenszyklus des Bakteriums *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* exprimiert Oberflächenproteine und lösliche Proteine, die es dem Bakterium ermöglichen an die Oberfläche der Zielzelle zu binden, aus der phagozytischen Vakuole zu entkommen und sich in der Wirtszelle zu bewegen. Internalin A (InlA) und InlB vermitteln die Bindung von Listerien an die Oberfläche der Zielzelle und Listeriolysin O (LLO) lysiert die Phagosomenmembran. Das *actin-assembly-inducing protein* (ActA) wird polarisiert exprimiert, katalysiert die Aktinpolymerisation und ermöglicht dem Bakterium sich in der Wirtszelle zu bewegen. Um aus der sekundären Vakuole in der neu infizierten Wirtszelle zu entkommen exprimieren Listerien die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase PlcB, eine Zink-Metalloprotease (Mpl) und LLO. (modifiziert nach [2])

Nach einer Aufnahme von Listerien durch kontaminierte Lebensmittel dringt *Lm* in die Darmpithelzellen ein. Hierfür interagiert das Protein Internalin A (InIA) auf *Lm* mit epitheliale Cadherin (E-Cadherin) auf den Epithelzellen. Listerien durchqueren die Epithel-Zell-Schicht des Darms und verbreiten sich über den Blutstrom in andere Organe, wie Milz und Leber in der Maus und zusätzlich in das Gehirn im Menschen und anderen Säugern. Das Eindringen von *Lm* in die Organe geschieht über geweberesidente Makrophagen. Mit Hilfe von Internalin B (InIB) werden Listerien in die Phagosomen von Makrophagen aufgenommen. Die Ansäuerung des Phagosoms der Makrophagen aktiviert ein Hämolyysin der Listerien, das Listeriolysin O (LLO). Zusammen mit verschiedenen Phospholipasen bildet LLO Poren in der phagosomalen Membran und erlaubt *Lm* das Eindringen ins Zytosol, wo es sich vermehrt. Im Zytosol synthetisiert *Lm* polar die Aktinpolymerase *actin-assembly-inducing-protein* (ActA). ActA verursacht die Polymerisation des Aktins und erlaubt den Listerien dadurch sich im Zytosol der Wirtszelle fortzubewegen. Diese Aktinpolymerisation führt auch zu Ausstülpungen der Zellmembran in die angrenzende Nachbarzelle. An der Spitze dieser Ausstülpungen befinden sich die Listerien. In der Nachbarzelle schnürt sich die Einstülpung als Vakuole ab. Die Listerien befreien sich dann wieder durch die bereits beschriebenen Mechanismen. Listerien können sich so von Zelle zu Zelle innerhalb eines Gewebes ausbreiten ohne den intrazellulären Raum zu verlassen, weshalb die Mechanismen der humoralen Immunantwort weitgehend wirkungslos gegen Listerien sind [2, 4].

1.1.2 Die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes*

In der frühen Phase der Infektion wird *Lm* durch das angeborene Immunsystem kontrolliert. Hierbei spielen geweberesidente Makrophagen und anschließend Granulozyten und inflammatorische Monozyten eine große Rolle. Diese Antwort wird durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) unterstützt. Durch das angeborene Immunsystem wird die Replikation der Bakterien begrenzt, was unerlässlich für das Überleben des Wirts ist. Die humorale Immunantwort hat aufgrund der intrazellulären Lebensweise von Listerien nur eine untergeordnete Bedeutung. Für die Klärung der Listerieninfektion ist das adaptive Immunsystem notwendig. Hierbei sind $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor⁺ (TZR) T-Zellen entscheidend. CD8⁺ T-Zellen setzen inflammatorische Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), frei und wirken über zytotoxische Mechanismen. Die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen führt zur Tötung infizierter Zellen und dadurch zur Freisetzung der Listerien. Phagozyten, die durch Zytokine aktiviert wurden, erkennen die Listerien, nehmen sie auf und verdauen sie. CD4⁺ T-Zellen entwickeln während einer Infektion mit Listerien eine TH-1 (T-Helferzellen Typ I) Antwort. Sie produzieren ebenfalls inflammatorische Chemokine und Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α . Die durch TH-1 und CD8⁺ T-Zellen freigesetzten Zytokine wirken auf Makrophagen und aktivieren sie. Aktivierte Makrophagen besitzen effektive antibakterielle Mechanismen, wie NO, O-Radikale, Hydrolasen im Lysosom und eine effiziente Phagosomenreifung, die es erlauben die Listerien effizient

zu töten.

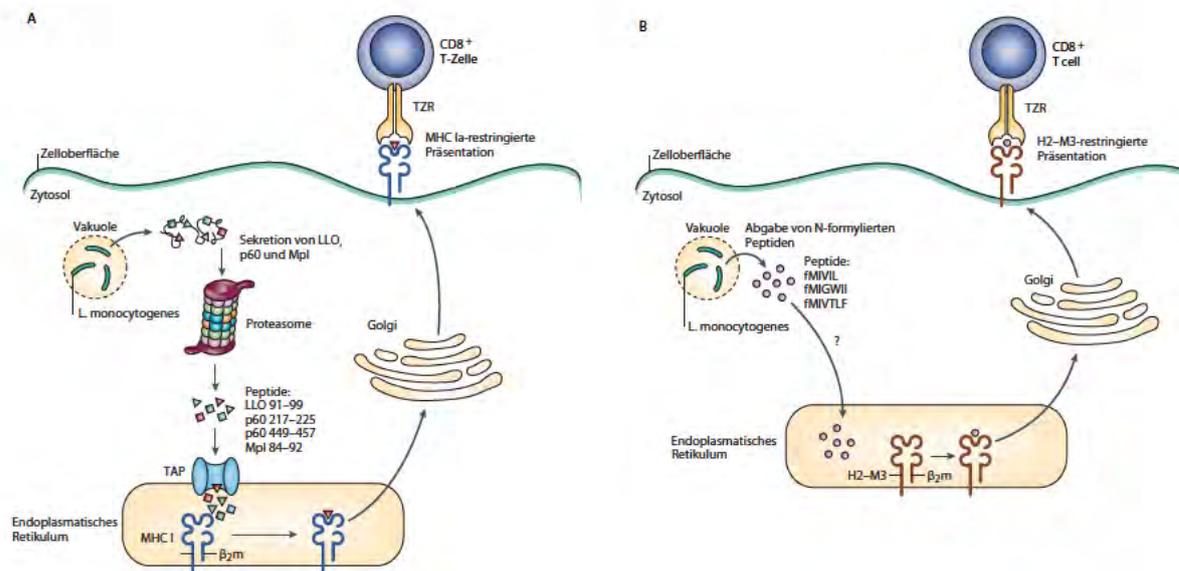


Abbildung 1.2: Präsentation von Listerien-spezifischen Peptiden. Antigene von Listerien, die $CD8^+$ T-Zellen präsentiert werden, können in zwei Gruppen eingeteilt werden. (A) Antigene, die über MHC Ia-Moleküle präsentiert werden, stammen von Proteinen, die die Listerien ins Zytosol der Wirtszelle sekretieren und im Proteasom degradiert werden. (B) Antigene, die über H2-M3 MHC Ib-Moleküle präsentiert werden, werden von Listerien in die infizierte Zelle entlassen, bestehen aus kurzen hydrophoben Peptiden und beginnen mit N-formyl Methionin (fM). β_2m , β_2 -Mikroglobulin; LLO, Listeriolysin O; Mpl, Zink-Metalloprotease; p60, murine Hydrolase; TAP, *transporter associated with antigen processing*; TZR, T-Zellrezeptor. (modifiziert nach [2])

An der Immunantwort der Maus gegen Listerien sind zwei Gruppen von $CD8^+$ T-Zellen beteiligt. Zu der ersten Gruppe gehören klassisch MHC Ia (*major histocompatibility complex Ia*) restringierte $CD8^+$ T-Zellen. Diese $CD8^+$ T-Zellen erkennen überwiegend durch Listerien ins Zytosol sekretierte Proteine und sind entscheidend für die Klärung der Listerieninfektion. Ein Beispiel für ein MHC Ia präsentiertes Protein ist der Virulenzfaktor LLO. Listerien sekretieren LLO ins Zytosol der Wirtszelle, wo es von Proteasomen degradiert wird. Die LLO-Peptide werden über den TAP (*transporter associated with antigen processing*) ins ER transloziert, binden dort an MHC I-Moleküle und werden an die Zelloberfläche exportiert. Die zweite Gruppe sind MHC Ib restringierte $CD8^+$ T-Zellen, die Bakterien-spezifische Peptide erkennen. Das MHC Ib Molekül H2-M3 bindet und präsentiert Peptide, die am N-Terminus ein Formyl-Methionin enthalten. Andere Abbauprodukte von bakteriellen Proteinen werden zum Beispiel von dem MHC Ib Molekül Qa2 gebunden und präsentiert. Listerien-infizierte Zellen werden aufgrund der Präsentation von Listerienpeptiden durch MHC Ia und MHC Ib von $CD8^+$ T-Zellen erkannt. Diese Präsentation hat verschiedene Konsequenzen. Die Präsentation von Listerienantigenen durch Dendritische Zellen führt zur primären Aktivierung (*Priming*) von $CD8^+$ T-Zellen, die dann Proliferieren und Effektoreigenschaften erwerben. In infizierten Geweben werden Listerienantigene insbesondere durch Makrophagen präsentiert. Dies führt zu einer Aktivierung

der Effektorzellen. Konsequenzen sind die Produktion von Zytokinen und die Zytotoxizität. Bei einer sekundären Infektion sind in erster Linie $CD8^+$ T-Zellen für die Kontrolle der Infektion entscheidend. Nach der primären Infektion bildet sich ein *Pool* von $CD8^+$ T-Gedächtniszellen, so dass bei der sekundären Infektion deutlich mehr spezifische $CD8^+$ T-Zellen zur Verfügung stehen. Zusätzlich benötigen diese Gedächtniszellen kein *Priming* und sind weniger von Kosignalen abhängig. Als Folge findet eine extrem effiziente T-Zellantwort statt, die innerhalb weniger Tage zu einer Klärung der Infektion führt und auch gegenüber normalerweise letalen Infektionsdosen schützt [2, 5, 6].

1.1.3 Der Verlauf der Listerien-Infektion im Mausmodell

Mäuse weisen im Vergleich zum Menschen ein verändertes E-Cadherin auf, das nur schlecht mit Internalin A interagiert. In Folge dringen Listerien nur sehr ineffizient in Darmepithelzellen ein und eine systemische Ausbreitung erfolgt nur nach einer oralen Infektion mit sehr hohen Inokula. Im Mausinfektionsmodell wird deshalb meistens eine sublethale Listeriendosis intravenös oder intraperitoneal injiziert. Auch bei diesen Infektionsrouten sind die primären Zielorgane Milz und Leber. In diesen Organen findet dann eine massive Bakterienreplikation statt. Die Infektion nimmt einen typischen Verlauf, wobei die Kinetik in beiden Organen ähnlich aussieht. Die Bakterienlast steigt bis Tag 2 nach Infektion an, bevor sich eine Plateauphase mit gleich bleibender Bakterienlast ausbildet. In der frühen Phase und zu Beginn der Plateauphase wird die Infektion durch das angeborene Immunsystem kontrolliert. Die primäre Aktivierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen beginnt wenige Stunden nach Listeriengabe und erreicht ihr Maximum acht bis zehn Tage nach Infektionsbeginn. Ab etwa Tag 5 beginnt die erworbene Immunantwort gegen die Listerien Wirkung zu zeigen und zu diesem Zeitpunkt erreichen die Zahlen an Listerien-spezifischen T-Zellen auch die Nachweisgrenze von Standardnachweismethoden. Eine effektive T-Zellantwort eliminiert die Listerien bis Tag 10 vollständig aus dem Organismus. Bei der sekundären Immunantwort gegen Listerien ist aufgrund der bereits vorhandenen Gedächtniszellen die Immunantwort deutlich schneller und stärker. Die Klärung der Listerien erfolgt normalerweise schon innerhalb von zwei bis drei Tagen. Das Maximum der T-Zellantwort bei einer sekundären Immunantwort gegen Listerien wird nach fünf bis sechs Tagen erreicht [2, 5].

1.2 $CD8^+$ T-Zellen

T-Lymphozyten oder T-Zellen bilden zusammen mit B-Lymphozyten die adaptive Immunantwort. Vorläufer von T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und wandern in den Thymus um dort auszureifen. Im Thymus findet die Ausbildung des T-Zellrezeptors (TZR) durch somatische Rekombination statt. Der TZR ermöglicht den T-Zellen körperfremde Antigene zu erkennen. T-Zellantigene sind kurzkettige Peptide, die durch Antigen-präsentierende Zellen

(APZ) im Komplex mit MHC-Molekülen präsentiert werden. Im Thymus erfolgt die positive und negative Selektion der T-Zellen. Während der positiven Selektion wird sichergestellt, dass T-Zellen eine ausreichende Affinität zu MHC-Molekülen aufweisen und an sie binden können. Die negative Selektion hingegen verhindert das Überleben von T-Zellen, die zu stark an MHC binden und gegen körpereigene Antigene reagieren könnten. Nach der Reifung und Selektion verlassen die entstandenen T-Zellen den Thymus und zirkulieren im Organismus.

Der TZR ist im Fall von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen ein $\alpha\beta$ -Heterodimer und mit CD3-Proteinen assoziiert. Während der Aktivierung des TZR geben CD3-Proteine das TZR-Signal über ITAM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ins Zellinnere weiter. Nach Aktivierung des TZR werden die ITAM phosphoryliert und ermöglichen dadurch die Bindung von ZAP70-Tyrosinkinase an die CD3-Proteine. Es kommt zur Aktivierung der Phospholipase C- γ , die wiederum Transkriptionsfaktoren aktiviert. In CD8⁺ T-Zellen wird eine spezifische Gentranskription durch Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und AP-1 (*activator protein-1*) induziert. CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptid im Komplex mit MHC I-Molekülen. Dabei unterstützt das CD8-Dimer die Bindung des TZR an MHC I. CD4⁺ T-Zellen hingegen erkennen Peptid im Komplex mit MHC II-Molekülen. Die Antigene für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterscheiden sich durch die Präsentation über MHC I- oder MHC II-Moleküle. Während MHC II extrazelluläre Antigene präsentiert, zeigen MHC I-Moleküle Antigene, die im Zytosol der Zelle lokalisiert sind. Eine Ausnahme bildet die Kreuzpräsentation durch dendritische Zellen (DZ). DZ können extrazelluläres Antigen aufnehmen und dann über MHC I-Moleküle präsentieren. MHC I-Moleküle werden auf allen Zellen des Körpers exprimiert, während MHC II-Moleküle überwiegend auf professionellen APZ, wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen zu finden sind [7].

1.2.1 Die CD8⁺ T-Zellantwort

Für die Ausbildung einer effektiven CD8⁺ T-Zellantwort muss die naive CD8⁺ T-Zelle durch eine professionelle APZ aktiviert werden. Normalerweise geschieht die primäre Aktivierung in einem sekundären lymphatischen Gewebe durch eine DZ. CD8⁺ T-Zellen erkennen das an MHC I gebundene Antigen auf der DZ und werden mit Hilfe von Kosignalen, die durch die DZ und das Umfeld zur Verfügung gestellt werden, umfassend aktiviert. Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen induziert neben der Proliferation auch die Differenzierung zu zytotoxischen Effektorzellen. Diese Effektorzellen verlassen die lymphatischen Gewebe und zirkulieren durch den Körper um auf ihr Antigen zu treffen. Nach Erkennung ihres Antigens werden CD8⁺ T-Zellen nun auch ohne klassische Kosignale aktiviert und reagieren mit verschiedenen Effektormechanismen. CD8⁺ T-Zellen enthalten zytotoxische Granula, die vor allem Perforine und Granzyme beinhalten. Nach Aktivierung entleeren CD8⁺ T-Zellen den Inhalt ihrer zytotoxischen Granula in die Kontaktzone zur Zielzelle. Perforine bilden in der Zielzelle eine Pore, durch die die Granzyme eindringen können. Sowohl die Porenbildung selbst, als auch die

durch Granzyme hervorgerufene Aktivierung von Caspasen lösen in den Zielzellen den programmierten Zelltod, die Apoptose, aus. Eine weitere Effektorfunktion von aktivierten CD8⁺ T-Zellen ist die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine. IFN- γ und TNF- α induzieren zum Beispiel bakterizide Mechanismen in Makrophagen [7].

1.2.2 Die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung

Die Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen in verschiedene Effektor- und Gedächtnisstadien wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Expression bestimmter Oberflächen- und Effektormoleküle ist charakteristisch für die verschiedenen Differenzierungsstadien [8]. Nach Stimulation des TZR werden CD8⁺ T-Zellen aktiviert und differenzieren durch weitere Signale zu Effektor- und Gedächtniszellen. Kostimulatorische Moleküle auf der APZ und Signale aus der inflammatorischen Umgebung führen zur umfassenden Aktivierung und Differenzierung der naiven CD8⁺ T-Zellen. Wichtige kostimulatorische Signale werden durch die Interaktion von CD28 auf T-Zellen mit CD80/CD86 auf professionellen APZ, von CD27 mit CD70, 4-1BB mit seinem Liganden, ICOS mit dem ICOS-Liganden und durch CD154 - CD40 Interaktionen geliefert. Aus dem Umfeld liefern hauptsächlich Zytokine, wie Typ I Interferone (IFN- α und IFN- β), IFN- γ , Interleukin-2 (IL-2), IL-12 und IL-27 proinflammatorische Signale. Die Reifung von CD8⁺ T-Effektorzellen wird insbesondere durch Typ I IFN und IL-12 gefördert [7, 9, 10, 11]. In der frühen Phase der T-Zellantwort weisen CD8⁺ T-Zellen eine hohe Proliferationsrate auf und sind durch die Differenzierung zu CD8⁺ T-Effektorzellen gekennzeichnet. In der Population der CD8⁺ T-Effektorzellen können bereits einige Zellen als Gedächtniszellvorläufer identifiziert werden. Diese Zellen weisen eine hohe Expression der Interleukin-7-Rezeptor- α -Untereinheit (CD127), von CD27 und von Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) auf. Terminale Effektorzellen hingegen exprimieren viel KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*), was auf Gedächtniszellvorläufern nicht zu finden ist [8, 12, 13, 14].

Zum Überstehen der Kontraktionsphase und zum Langzeitüberleben benötigen CD8⁺ T-Gedächtniszellen Zytokine wie IL-7 und IL-15 [15]. T-Gedächtniszellen werden in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Man unterscheidet zwischen zentralen CD8⁺ T-Gedächtniszellen und CD8⁺ T-Effektorgedächtniszellen, die in der Maus über die Expression der Moleküle CD44 und CD62L identifiziert werden können. Während zentrale Gedächtniszellen beide Moleküle exprimieren, ein großes proliferatives Potential besitzen und IL-2 produzieren, exprimieren Effektorgedächtniszellen nur CD44 und weisen konstitutiv Effektorfunktionen wie die Zytotoxizität auf [16, 17].

CD8⁺ T-Zellen können bei chronischem Antigenkontakt in den Zustand der "Exhaustion", eine Art Erschöpfungszustand, geraten. Chronischer Antigenkontakt kann in Mäusen zum Beispiel durch Infektion mit bestimmten Stämmen des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) ausgelöst werden. CD8⁺ T-Zellen, die in den Erschöpfungszustand geraten, sind durch eine verminderte Produktion von Zytokinen, wie IL-2, IFN- γ und TNF- α , gekennzeichnet und wei-

sen eine geringere Zytotoxizität auf. Weiterhin ist die Expression verschiedener inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1 (*programmed death 1*), LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*) und CD244 erhöht [18, 19].

1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine sind chemotaktisch aktive Cytokine mit einem Molekulargewicht von 6 bis 14 kDa [20]. Chemokine ähneln sich in ihrer Aminosäuresequenz und induzieren bei Zellen mit entsprechendem Rezeptor eine gerichtete Bewegung hin zum Produktionsort der Chemokine. Chemokinrezeptoren sind integrale Membranproteine mit sieben transmembranen Helices, deren Signalweiterleitung in die Zelle über G-Proteine erfolgt. Abbildung 1.3 zeigt eine Zusammenfassung der biologischen Aufgaben von Chemokinen und Chemokinrezeptoren.

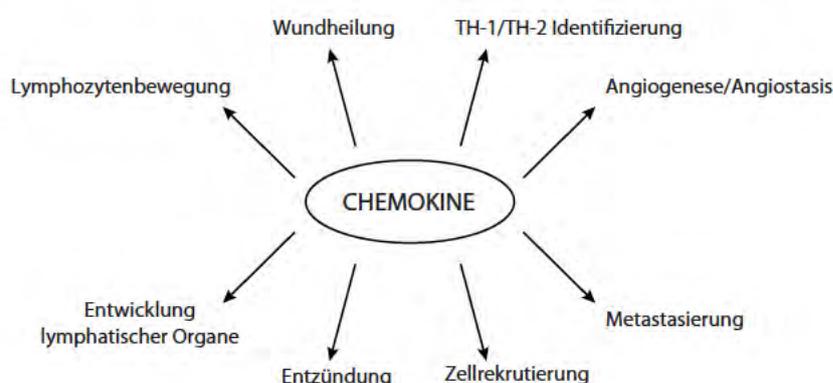


Abbildung 1.3: Biologische Funktionen von Chemokinen und Chemokinrezeptoren. (modifiziert nach [21])

1.3.1 Chemokine

Bis heute sind mehr als 50 Chemokine bekannt [22]. Sie werden aufgrund der Anzahl und Konservierung ihrer ersten beiden N-terminalen Cysteinreste in vier Gruppen eingeteilt. Man unterscheidet zwischen CC, CXC, CX3C und XC Chemokinen. Bei CC-Chemokinen sind die ersten beiden Cysteinreste direkt benachbart, während die Cysteinreste von CXC-Chemokinen durch eine und von CX3C-Chemokinen durch drei andere Aminosäuren voneinander getrennt sind. XC-Chemokine enthalten nur einen konservierten Cysteinrest. Bei den CXC-Chemokinen unterscheidet man zusätzlich zwischen ELR⁺ und ELR⁻ Chemokinen. ELR⁺ Chemokine enthalten im Gegensatz zu den ELR⁻ Chemokinen das konservierte Aminosäuremotif Glutaminsäure-Leucin-Arginin-Cystein-X-Cystein. Sie wirken als chemoattraktive Substanz für Neutrophile und sind wichtig bei der Angiogenese. ELR⁻ Chemokine binden an andere Rezeptoren, sind angiostatisch und wirken hauptsächlich auf T-Lymphozyten. Die meisten Chemokine gehören zu den CC- und CXC-Chemokinen [21, 23, 24]. Normalerweise werden Chemokine als lösliche

Proteine sekretiert. Die Ausnahme bilden die membrangebundenen Chemokine Fraktalin und CXCL16 [25, 26].

Neben der Klassifizierung anhand der Anordnung der ersten beiden Cysteinreste werden Chemokine zusätzlich aufgrund ihrer Expression und Funktion differenziert. Während eine Gruppe von Chemokinen wichtig für die Kontrolle von inflammatorischen Prozessen ist, sind andere Chemokine an der normalen homöostatischen Wanderung von Leukozyten im gesunden Gewebe beteiligt. Inflammatorische Chemokine werden durch proinflammatorische Signale induziert und steuern die Migration von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems zum Ort der Infektion. Homöostatische Chemokine regulieren hingegen die Wanderung von Leukozyten zwischen primären und sekundären lymphatischen Geweben, zwischen verschiedenen Zonen innerhalb dieser Gewebe, aber auch die Zirkulation von Zellen in peripheren Geweben und die Akkumulation von Zellen in bestimmten Geweben wie Haut oder Darmmukosa [23, 25, 27].

Chemokine regulieren die Einwanderung von Leukozyten in Gewebe durch die Bereitstellung von Signalen, die es den Leukozyten erlauben mit ihrer Umgebung zu reagieren. Die Migration einer frei im Blutstrom zirkulierenden Zelle in ein Gewebe ist in vier Schritte unterteilt (Abbildung 1.4). Der erste Schritt ist eine schwache Bindung von Leukozyten an das Gefäßendothel. Dieser Vorgang wird durch Wechselwirkungen von Selektinen auf den Endothelzellen mit den entsprechenden Kohlenhydratliganden auf den Leukozyten induziert und führt dazu, dass die Zellen langsam am Endothel entlangrollen. Im zweiten Schritt kommt es zu stärkeren Wechselwirkungen. Chemokine lagern sich an die Glykostrukturen der Gefäßwände an und aktivieren den entsprechenden Chemokinrezeptor auf Leukozyten. Dies führt zur Aktivierung von Integrinen, wie LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) und VLA-4 (*very late antigen 4*), die dann ihre Liganden ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*) auf dem Endothel binden. Es kommt zur stabilen Interaktion zwischen diesen Molekülen, wodurch die Rollbewegung beendet wird. Im nächsten Schritt erfolgt die Extravasation. Hierbei durchdringen die Leukozyten die Wand des Blutgefäßes und gelangen ins Gewebe. Im letzten Schritt folgen die Leukozyten einem lokalen Chemokingradienten und wandern zum Ort der Infektion. Die Migration wird durch Chemokin-induzierte Änderungen im Aktin-Zytoskelett ermöglicht [22].

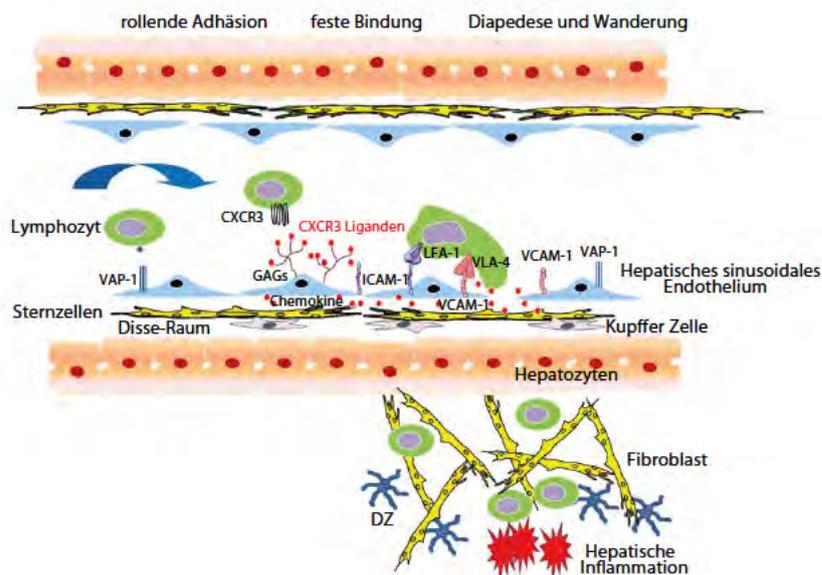


Abbildung 1.4: Einwanderung von Leukozyten in die Leber. Die Einwanderung von Leukozyten in ein Gewebe ist in vier Schritte unterteilt: Rollende Adhäsion, feste Bindung, Diapedese und Wanderung im Gewebe. VAP-1, *vascular adhesion protein 1*; CXCR, Chemokin (CXC-Motiv) Rezeptor; GAG, Glykosaminoglykan; ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*; VCAM-1, *vascular cell adhesion protein 1*; LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*; VLA-4, *very late antigen 4*; DZ, Dendritische Zelle. (modifiziert nach [22])

1.3.2 Chemokinrezeptoren

Es sind mehr als 20 Chemokinrezeptoren bekannt [22]. Sie gehören zur Gruppe der Sieben-Transmembran-durchspannenden Rezeptoren und sind G-Protein gekoppelt. Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Darstellung des Chemokinrezeptors CXCR1 als Beispiel für den generellen Aufbau von Chemokinrezeptoren. Chemokinrezeptoren haben eine ungefähre Länge von 350 Aminosäuren. Sie besitzen einen extrazellulären sauren N-Terminus, der an Tyrosinresten sulfatiert sein kann und N-gekoppelte Glykosylierungsstellen enthält. Der C-Terminus liegt intrazellulär und enthält Serin- und Threoninreste, die zur Aktivierung und Regulierung des Rezeptors phosphoryliert werden können. Chemokinrezeptoren enthalten sieben transmembrane α -helikale Domänen, die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen mit hydrophilen Aminosäuren miteinander verbunden sind. Die ersten beiden Schleifen sind über eine Disulfidbrücke zwischen hoch konservierten Cysteinresten miteinander verbunden. Über den C-terminalen intrazellulären Teil des Rezeptors und möglicherweise auch über die dritte intrazelluläre Schleifen ist CXCR1 an das G-Protein gekoppelt [28].

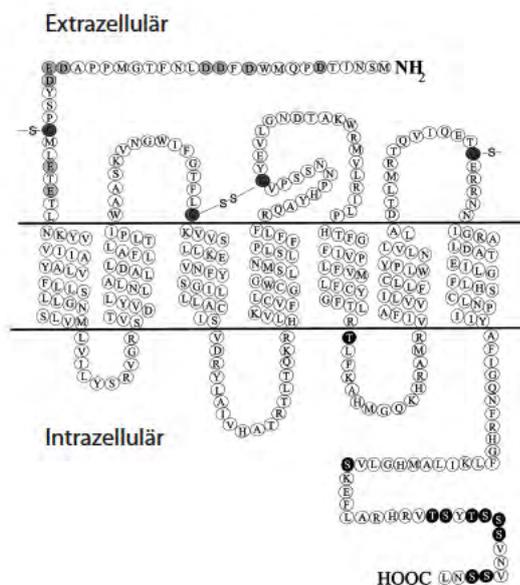


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Chemokinrezeptors CXCR1. N-terminale saure Reste sind schattiert, C-terminale potentiell phosphorylierte Reste sind schwarz hinterlegt, konservierte Cysteine sind schwarz dargestellt. (modifiziert nach [28])

Verschiedene Leukozyten exprimieren ein jeweils typisches Profil von Chemokinrezeptoren, die jeweils spezifisch für bestimmte Chemokine sind. Die Ligandenspezifität der einzelnen Chemokinrezeptoren kann überlappen. So gibt es einerseits Chemokine, die an verschiedene Chemokinrezeptoren binden und andererseits Chemokinrezeptoren, die unterschiedliche Chemokine erkennen. Neben Rezeptoren, die mehrere Chemokine aus einer Familie binden existieren aber auch Rezeptoren, die nur einen Liganden haben [23, 25, 29]. Generell binden Chemokinrezeptoren, die an der homöostatischen Leukozytenbewegung beteiligt sind, meist nur einen oder wenige Liganden, während proinflammatorische Chemokinrezeptoren häufig mit mehreren Chemokinen interagieren [21, 23].

Die Anzahl der Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von Zellen ist abhängig vom Recycling und von der Neusynthese. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden nach Ligandenbindung internalisiert und entweder wiederverwendet oder abgebaut [30]. Die Bindung eines Chemokins an den Chemokinrezeptor führt neben der Internalisierung auch zur Phosphorylierung des Rezeptors und zur Dissoziation des Rezeptor-assoziierten trimeren $G\alpha\beta\gamma$ -Proteins. Die $G\alpha$ -Proteinuntereinheit wird durch Bindung von GTP (Guanosin triphosphat) aktiviert und trennt sich von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert die Phospholipasen $C\alpha1$ und $\alpha2$ und induziert die Bildung von Inositol-(1,4,5)-Triphosphat und Diacylglycerol. Es werden Calciumkanäle in der Zellmembran geöffnet, wodurch es zum Calciumeinstrom und zur Aktivierung der Proteinkinase C kommt. Die Proteinkinase C initiiert eine Signaltransduktionskaskade, während der verschiedene Serin/Threonin Kinasen und Tyrosin Kinasen aktiviert werden [23, 29, 31].

1.3.3 Der Chemokinrezeptor CXCR6 und sein Ligand CXCL16

Der Chemokinrezeptor CXCR6 (CD186), auch bekannt als Bonzo, STRL33 (*seven transmembrane receptor-like from clone 33*) oder TYMSTR (*T lymphocyte-expressed seven-transmembrane domain receptor*), erkennt nur das Chemokin CXCL16 oder SR-PSOX (*scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipids*) und ist bisher auch der einzig bekannte Rezeptor für dieses Chemokin. CXCR6 wurde erstmals als Korezeptor für SIV (*simian immunodeficiency virus*) und HIV (*human immunodeficiency virus*) beschrieben [32, 33] und wird auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und Plasmazellen exprimiert [34]. Das Chemokin CXCL16 existiert sowohl als lösliches Protein als auch in membrangebundener Form. Transmembranes CXCL16 wird von Makrophagen, Monozyten, DZ und B-Zellen exprimiert und fungiert einerseits als Ligand für CXCR6-exprimierende Zellen und andererseits als Scavenger Rezeptor, der Phosphatidylserin und oxidierte Lipoproteine bindet [35]. Lösliches CXCL16 wird durch Proteasen-vermittelte Abspaltung der membrangebundenen Form gebildet. Während ADAM-10 (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) sowohl konstitutiv als auch nach Induktion CXCL16 von der Oberfläche abspaltet, erfolgt die Abspaltung durch ADAM-17 (*tumor necrosis factor (TNF)- α converting enzyme 17*) ausschließlich nach Induktion [36].

CXCR6 besteht im Menschen aus 342 und in der Maus aus 351 Aminosäuren. Das Protein hat eine molekulare Masse von ca. 40 kDa. Der murine Rezeptor ist in 75 % seiner Proteinsequenz identisch mit dem humanen CXCR6. Das Gen des humanen Proteins ist auf dem Chromosom 3, das Gen des murinen Proteins auf dem Chromosom 9 lokalisiert.

Für CXCR6 und CXCL16 konnte in der Maus in verschiedenen Krankheitsmodellen eine Funktion gezeigt werden. In NOD (*nonobese diabetic*) und NOR (*nonobese resistant*) Mäusen wurde ein SNP (*single-nucleotide polymorphism*) im CXCL16-Gen identifiziert, was auf eine Funktion des Chemokins in der Entwicklung des Diabetes in den NOD-Mäusen hindeutet [37]. Die Defizienz von CXCL16 in Ldlr (*low-density lipoprotein receptor*)-knockout Mäusen führt zu einer beschleunigten Entwicklung einer Artherosklerose, während die Defizienz von CXCR6 in ApoE (*Apolipoprotein E*)-knockout Mäusen eine verminderte Artherosklerose zur Folge hat [38, 39]. In einem Modell des allergischen Asthmas zeigen T-Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen eine stärkere CXCR6-Expression [40]. Eine höhere Expression von CXCR6, aber auch von CXCL16, wird in einem *Graft-versus-host* (GvH) Krankheitsmodell nach Knochenmarktransplantation in Lunge und Leber beobachtet [41]. Nach einer Herztransplantation führt die Blockade des CXCR6-CXCL16-Systems zu einer verminderten Akkumulation von NKT-Zellen im Herzen und bewirkt eine verstärkte Abstoßung des transplantierten Organs [42]. CXCR6 wird für die Akkumulation von Lymphozyten am Ort von kortikalen Verletzungen im Gehirn benötigt [43] und IFN- γ ⁺CXCR6⁺ MBP (*myelin basic protein*)-reaktive T-Zellen zeigen eine Korrelation der CXCR6-Expression mit der Ausbildung des Effektorgedächtnis-Phänotyps [44]. Im Nephritis-Modell kommt es nach Behandlung der Tiere mit Prednisolon zur Hochregulation der CXCR6

und CXCL16 mRNA in den Glomeruli von MRL-lpr Mäusen (Mäuse mit einer verstärkten Lymphoproliferation) [45]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach Inhibition von CXCL16 die Antikörper-assoziierte Glomerulonephritis verstärkt ist [46]. In einem Modell der Rheumatoiden Arthritis wird in der Gelenkflüssigkeiten mehr lösliches CXCL16 nachgewiesen und 30-50 % der in die drainierenden Lymphknoten infiltrierenden Leukozyten exprimieren CXCR6 [47].

Im Menschen werden der Chemokinrezeptor CXCR6 und sein Ligand CXCL16 ebenfalls mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Kindern mit Typ I Diabetes eine geringere Expression von CXCR6 aufweisen [48] und mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, die aus pankreatischen Inseln isoliert wurden, CXCR6 exprimieren [49]. Im Serum und Dickdarm von Patienten mit Morbus Crohn wird eine erhöhte Konzentration an CXCL16 nachgewiesen [50]. Tumore mit einer hohen CXCR6-Expression aus Patienten mit Prostatakrebs zeigen verstärktes Wachstum und Angiogenese [51]. In Krebszelllinien und primären Karzinomen konnte nach Aktivierung von CXCR6 ein verstärktes Wachstum [52] und nach Bestrahlung eine Hochregulation von CXCL16 festgestellt werden [53]. Weiterhin konnte eine inverse Korrelation zwischen der CXCL16-Expression und der Progression von Nierenkarzinomen gezeigt werden [54]. CXCR6 wird in Melanomen und Metastasen von Melanomen exprimiert [55]. Auch für HIV und AIDS (*acquired immunodeficiency syndrom*) besteht eine Assoziation mit CXCR6, da CXCR6 ein Korezeptor für HIV-1 und HIV-2 ist [33, 56]. Ein Polymorphismus im CXCR6-Gen korreliert mit der Entwicklung von AIDS. Liegt eine bestimmte Variante des CXCR6-Gens homozygot vor, so verzögert sich der Zeitraum von der initialen AIDS-Diagnose bis zum Tod durch Lungenentzündung bei Medikation [57, 58]. Bei chronischen Leberinfektionen zum Beispiel durch das Hepatitis C Virus (HCV) kann eine verstärkte CXCL16 Expression in der Leber und eine Infiltrierung und Retention von CXCR6-exprimierenden Lymphozyten nachgewiesen werden [59]. Während einer GvH-Hepatitis wird ebenfalls eine gesteigerte Rekrutierung von CXCR6⁺CD8⁺ T-Zellen festgestellt [60]. In der Haut von Psoriasis-Patienten kann eine Überexpression von CXCL16 nachgewiesen werden [61]. Auch verschiedene Arthritiden werden mit CXCR6 und CXCL16 in Zusammenhang gebracht. In entzündeten Gelenken von Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis werden CXCR6 und CXCL16 von Synoviozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert und CXCR6-exprimierende T-Zellen infiltrieren in den entzündeten Bereich [62]. Eine erhöhte Konzentration von CXCL16 im Gelenkwasser, die zumindest zum Teil aus aktivierten Makrophagen stammt, führt bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu gesteigerter Rekrutierung von CD8⁺ T-Gedächtniszellen [63, 64].

Insgesamt gibt es sehr gute Hinweise dafür, dass CXCR6 und sein Ligand CXCL16 unter homöostatischen Bedingungen und insbesondere im Verlauf von Entzündungen und Infektionen eine wichtige Rolle für die Chemotaxis von Immunzellen spielen.

2 Zielsetzung

Die primären Zielorgane des Bakteriums *Listeria monocytogenes* sind in der Maus Milz und Leber. Listerien vermehren sich intrazellulär und infizieren neben Makrophagen auch nicht phagozytierende Zellen wie Hepatozyten. Aufgrund der intrazellulären Lebensweise des Bakteriums sind T-Zellen, insbesondere CD8⁺ T-Zellen, entscheidend für die Kontrolle der Listerieninfektion. Im Rahmen der Immunantwort findet eine Akkumulation von T-Zellen in den infizierten Organen statt. Da die primäre Aktivierung von T-Zellen ausschließlich in den T-Zellzonen von sekundären Lymphorganen erfolgt, muss die T-Zellakkumulation in den infizierten Organen auf der Rekrutierung von Effektor-T-Zellen beruhen. Im *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell sind die Mechanismen der T-Zellmigration nur unzureichend bekannt. Für die Beteiligung von Chemokin- und Chemokinrezeptor-Systemen gibt es nur wenige und zum Teil widersprüchliche Studien. Aus unveröffentlichten mRNA Expressionsanalysen war bekannt, dass *Listeria monocytogenes* spezifische CD8⁺ T-Zellen relativ hohe mRNA Level für die Chemokinrezeptoren CXCR6, CXCR3, CCR5 und CCR2, sowie moderate Level für die mRNA von CCR6 zeigten. Die hohe Expression des Chemokins CXCL16 in sinusoidalen Endothelien der Leber machte vor allem die Untersuchung des Chemokinrezeptors CXCR6 interessant. Aufgrund der bereits vorhandenen Daten wurde für die vorliegende Arbeit folgende Hypothese aufgestellt: Der Chemokinrezeptor CXCR6 reguliert die Aktivierung, die Differenzierung und die Migration von CD8⁺ T-Zellen während der Immunantwort der Maus gegen *Listeria monocytogenes*.

In einem ersten Teil der Arbeit sollte die Oberflächenexpression von CXCR6 auf verschiedenen CD8⁺ T-Zellsubpopulationen aus Milz und Leber im Verlauf der Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* charakterisiert werden und mit dem Differenzierungsgrad und der Funktion dieser Zellen korreliert werden. In CXCR6-defizienten Mäusen sollte dann die Funktion von CXCR6 in der Kontrolle der Listerieninfektion und der spezifischen T-Zellantwort aufgeklärt werden. Schließlich sollte die *Listeria monocytogenes* Infektion mit einem T-Zelltransfermodell kombiniert werden um die Funktion von CXCR6 für CD8⁺ T-Zellen *in vivo* detailliert zu untersuchen. Insgesamt sollte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Rolle des Chemokinrezeptors CXCR6 in der CD8⁺ T-Zellantwort führen.

3 Materialien

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Bacto Agar	BD (Heidelberg)
Brefeldin A (BFA)	Sigma (Steinheim)
Bromdesoxyuridin (BrdU)	BD (Heidelberg)
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Steinheim)
DNase I	Sigma (Steinheim)
F _c -Block	BioXCell (West Lebanon)
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA (Pasching)
Kollagenase D	Roche (Mannheim)
Kollagenase VIII	Sigma (Steinheim)
Natives Rattenserum (NRS)	Jackson Immuno Research (Baltimore)
<i>Percoll separating solution</i>	BIOCHROM AG (Berlin)
Saponin	Sigma (Steinheim)
Trypan Blau	BIOCHROM AG (Berlin)
<i>Tryptic Soy Broth (TSB)</i>	BD (Heidelberg)

Alle Standardchemikalien stammen von Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe).

3.2 Puffer und Lösungen

PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Sigma (Steinheim)
1 × PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Heparin-Natrium Braun "Multi"	BRAUN (Melsungen)
Trypan blue 0,5% (w/v)	BIOCHROM AG (Berlin)
Saponinpuffer	0,1 % (w/v) BSA 0,3 % (w/v) Saponin ad PBS
Erythrozytenlysepuffer	8,25 g NH ₄ Cl 1,0 g KHCO ₃ 0,037 g EDTA auf 1 L Aqua dest.
Färbepuffer	3 % FKS ad PBS
Annexin V-Puffer	0,14 M NaCl 0,25 mM CaCl ₂ 0,1 % NaN ₃ 0,01 M HEPES pH7,4 ad Aqua dest.
Heparin-Lösung	Heparin 1:10 in Aqua dest. verdünnt
BD FACSTM <i>Lysing Solution</i>	BD (Heidelberg)
<i>FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set</i>	eBioscience (San Diego)
BD FACSTFlow™	BD (Heidelberg)
FACS Clean	BD (Heidelberg)
BD FACSTM <i>Shutdown Solution</i>	BD (Heidelberg)

3.3 Stimulationssubstanzen

LLO ₁₈₉₋₂₀₁ (NEKYAQAYPNVS)	JPT (Berlin)
OVA ₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL)	JPT (Berlin)
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma (Steinheim)
Ionomycin	Sigma (Steinheim)
α CD3	Institut für Immunologie (UKE)
α CD28	Institut für Immunologie (UKE)
Proleukin S (Interleukin-2)	Novartis (Nürnberg)
Interleukin-15	PeproTech (Hamburg)
CXCL16	PeproTech (Hamburg)

3.4 Medien und Medienzusätze

RPMI 1640	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
FKS (Fötales Kälberserum)	PAA (Pasching)
β -Mercaptoethanol (1000 \times für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Gentamycin (1000 \times für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Glutamin (100 \times für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
RPMI komplett	10 % FCS
	2 mM Glutamin
	50 mg/mL Gentamycin
	50 μ M β -Mercaptoethanol
	ad RPMI-Medium
TSB-Medium	30 g/L TSB
	für Agar-Platten wird 2 % <i>Bacto Agar</i>
	hinzugefügt
	ad Aqua dest.

3.5 Fluoreszenz-markierte Materialien

3.5.1 Antikörper

Markierung	Spezifität	Klon	gegen	aus	Firma
PE	CD44	IM7	Maus	Ratte	BD (Heidelberg)
PE	IFN- γ	XMG1.2	Maus	Ratte	BD (Heidelberg)

Markierung	Spezifität	Klon	gegen	aus	Firma
PE	Ki-67	B56	Human	Maus	BD (Heidelberg)
PE	Isotyp für IgG1 κ	MOPC-21		Maus	BD (Heidelberg)
PE	TCR V α 2	B20.1	Maus	Ratte	eBioscience (San Diego)
PE	CD223 (Lag-3)	eBioC9B7W	Maus	Ratte	eBioscience (San Diego)
PE	TNF- α	TN3-19	Maus	Hamster	eBioscience (San Diego)
PE	CD279 (PD-1)	J43	Maus	Hamster	eBioscience (San Diego)
PE	V α 2-TZR	B20.1	Maus	Ratte	eBioscience (San Diego)
RPE	CD244.2	2B4	Maus	Maus	BD (Heidelberg)
RPE	CD4	RM4-5	Maus	Ratte	eBioscience (San Diego)
RPE	CD8 α	53-6.7	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
PerCP	CD4	RM4-5	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
PerCP	CD8 α	53-6.7	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
PerCP	CD90.2	53-2.1	Maus/ Ratte	Ratte	BioLegend (San Diego)
PE-Cy7	TNF- α	MP6-XT22	Maus	Ratte	BD (Heidelberg)
PE-Cy7	TNF- α	MP6-XT22	Maus	Ratte	eBioscience (San Diego)
PE-Cy7	CD8 α	53-6.7	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
APC	CD8 α	53-6.7	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
APC	CD4	RM4-5	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
AF647	IFN- γ	XMG1.2	Maus	Ratte	eBioscience (San Diego)
APC-Cy7	CD62L	MEL-14	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
APC-Cy7	CD3 ϵ	145-2C11	Maus	Hamster	BioLegend (San Diego)
APC-Cy7	CD4	RM4-5	Maus	Ratte	BioLegend (San Diego)
V450	TNF- α	MP6-XT22	Maus	Ratte	BD (Heidelberg)
V450	IFN- γ	XMG1.2	Maus	Ratte	BD (Heidelberg)
eFluor 450	CD4	RM4-5	Maus	Ratte	eBioscience (San Diego)
eFluor 450	CD90.1	HIS51	Maus/ Ratte	Ratte	eBioscience (San Diego)
FITC	V α 2-TZR	B20.1	Maus	Ratte	BD (Heidelberg)

3.5.2 Lebend/Tot Farbstoffe

4',6-diamidino-2-phenylindole (Dapi)

Merck (Darmstadt)

AlexaFluor-750 Succinimidyl Ester

Invitrogen (Karlsruhe)

3.5.3 Reagenzien zur Proliferations- und Apoptosebestimmung

<i>Cell Proliferation Dye eFluor 670</i>	eBioscience (San Diego)
<i>APC BrdU Flow Kit</i>	BD (Heidelberg)
AF647 Annexin V	eBioscience (San Diego)
<i>SR-FLICA™ in vitro Poly Caspases Kit</i>	ImmunoChemistry Technologies (Bloomington)

3.6 Sonstige Materialien

<i>MACS Separation Column</i> (LD-Säule)	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
α -FITC <i>MACS MicroBeads</i>	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)

Die Standardlabormaterialien (wie zum Beispiel Plastikpipetten und Reaktionsröhrchen) stammen von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frikenhausen), Nunc (Langenselbold), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

3.7 Mauslinien

C57BL/6	Jackson Labs (Bar Harbour)
C57BL/6 Thy1.1 (B6.PL- <i>Thy1^a</i> /CyJ)	Jackson Labs (Bar Harbour)
CXCR6 ^{GFP/GFP}	bereitgestellt durch Prof. Dr. Ulf Panzer (III. Medizinische Klinik und Poliklinik am UKE, Hamburg) [65]
OT-I	rückgekreuzt auf C57BL/6, bereitgestellt durch das MPI Infektionsbiologie (Berlin) [66]
OT-I \times B6.PL- <i>Thy1^a</i> /CyJ	Institut für Immunologie (UKE, Hamburg)
RAG1 ^{-/-}	Jackson Labs (Bar Harbour)

Der CXCR6-defiziente Genotyp wurde mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) kontrolliert. Die Kontrolle des T-Zellrezeptor-transgens der OT-I-Mäuse erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse mit einem Antikörper gegen den T-Zellrezeptor V α 2. Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gezüchtet. Alle Tierversuche wurden nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.8 Bakterienstämme

Listeria monocytogenes

Stamm EGD (*LmEGD*)

bereitgestellt durch Prof. Dr. S. H. E.
Kaufmann (Berlin)

Listeria monocytogenes

Stamm OVA (*LmOVA*)

bereitgestellt durch Prof. Dr. H. Shen
(Philadelphia) [67]

3.9 Geräte

Zentrifuge

Varifuge 3.ORS

Heraeus (Hanau)

Sterilbank

HERA safe

Heraeus (Hanau)

FACS-Gerät

BD FACS Canto II

BD (Heidelberg)

Mikroskop

Leica DMIL

Leica (Wetzlar)

Brutschrank

HERA Cell

Heraeus (Hanau)

Bei den Geräten für Zell- und Bakterienkultur, sowie für Zell- und Bakterienaufreinigung handelt es sich um Standardlaborgeräte.

3.10 Software

Visualisierung der FACS-Daten

BD FACSDiva Software v6.1

FlowJo v10

BD (Heidelberg)

Tree Star, Inc. (Ashland)

Bearbeitung und Darstellung der Ergebnisse

Microsoft Excel

GraphPad Prism Version 4.0 und 5.0

Adobe Illustrator CS5.1

Microsoft Corporation (Redmond)

GraphPad Software, Inc. (La Jolla)

Adobe Systems, Inc. (San José)

4 Methoden

4.1 Infektion von Mäusen

Die verwendeten Mäuse wurden primär mit 1×10^4 *Listeria monocytogenes* EGD (*LmEGD*) oder *Listeria monocytogenes* OVA (*LmOVA*) und sekundär mit 5×10^5 *LmOVA* in 200 μ L *Phosphate Buffered Saline* (PBS) intravenös (iv) in eine der lateralen Schwanzvenen infiziert. Die Bakterien stammten aus einem bei -80 °C gelagerten Stock mit bekannter Konzentration. Die Bakterienkonzentration des Inokulums wurde durch Ausplattieren einer sequentiellen Verdünnungsreihe kontrolliert.

4.2 Transfer von OT-I Zellen in die Maus

Bei den Zelltransferversuchen sollten die verschiedenen Donor-Zellen voneinander unterschieden werden können und sich zusätzlich von den Zellen der Rezipienten unterscheiden. Die Wildtyp Donor-Zellen waren vom Mausstamm OT-I \times Thy1.1 und tragen daher die Oberflächenmoleküle CD90.1 (Thy1.1) und CD90.2 (Thy1.2). Alle CD8⁺ T-Zellen von OT-I transgenen Mäusen tragen einen Ovalbumin-spezifischen T-Zell-Rezeptor, der das Peptid Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ (OVA₂₅₇₋₂₆₄, SIINFEKL) im Kontext mit MHC I (H-2K^b) erkennt. Die CXCR6^{GFP/GFP} Donor-Tiere wurden auf einen OT-I transgenen Hintergrund gezüchtet und tragen ausschließlich das Oberflächenmolekül CD90.2. Die Lymphozyten wurden aus den Milzen dieser Mäuse aufgearbeitet (siehe Kap. 4.3.1) und die Zellzahl auf 5×10^4 Zellen pro 200 μ L PBS eingestellt. Diese Zellen wurden intravenös in die Rezipienten injiziert. Als Rezipienten wurden entweder Thy1.1-Mäuse verwendet, deren T-Zellen ausschließlich das Oberflächenmolekül CD90.1 tragen, oder RAG1^{-/-}-Mäuse, denen aufgrund des knock-out des *Recombination Activation Gene 1* (RAG1) B- und T-Zellen fehlen. Abbildung 4.1 zeigt als Beispiel das *Gating* von Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nach Transfer in Thy1.1-Mäuse. Die Kombination des OT-I Transfers mit der *LmOVA* Infektion, ermöglicht die Beobachtung einer spezifischen T-Zellantwort. Die Bakterien sekretieren in der infizierten Zelle eine verkürzte Form des Ovalbumins, das zu OVA₂₅₇₋₂₆₄ prozessiert und über MHC I auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Die transferierten OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus den transgenen OT-I Mäusen erkennen das auf MHC I präsentierte OVA-Peptid. Die Erkennung führt zu einer T-Zell-Rezeptor-spezifischen Aktivierung der T-Zellen. Der Transfer erlaubt daher die Beobachtung von frühen

Ereignissen der Primärantwort einer definierten T-Zellpopulation [68].

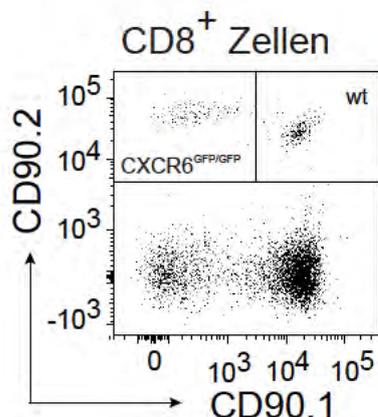


Abbildung 4.1: Identifizierung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen nach Transfer in Thy1.1-Mäuse. Die Auftragung der Oberflächenmoleküle CD90.1 und CD90.2 gegeneinander ermöglicht die Unterscheidung zwischen den einzelnen CD8⁺ T-Zellpopulationen. CXCR6-defiziente T-Zellen exprimieren ausschließlich CD90.2 und befinden sich im oberen linken Bereich. Wildtyp T-Zellen exprimieren neben CD90.2 auch das Oberflächenmolekül CD90.1 und befinden sich in der oberen rechten Region. Die endogenen Zellen exprimieren kein CD90.2 und sind im unteren Bereich lokalisiert. Endogene CD8⁺ Zellen unterteilen sich in CD8⁺ T-Zellen, die CD90.1 exprimieren und im unteren rechten Bereich zu finden sind, und andere CD8-exprimierende Zellen, wie Dendritische Zellen, die kein CD90.1 auf ihrer Oberfläche tragen und somit in der unteren linken Region zu finden sind.

4.3 Reinigung von Lymphozyten aus Organen der Maus

Die verwendeten Mäuse wurden am Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf gezüchtet und alle Versuche erfolgten nach den Bedingungen des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Mäuse wurden durch Inhalation von CO₂ und Genickbruch getötet.

4.3.1 Aufarbeitung von Lymphozyten aus der Milz

Die Milz wurde aus der Maus entnommen und in 5 mL PBS aufgenommen. Die Milz wurde zusammen mit dem PBS auf ein Metallsieb in eine Petrischale gegeben. Mit dem Kolben einer Spritze wurde die Milz in dem Sieb zerdrückt und homogenisiert. Das Sieb wurde mit 5 mL PBS gespült, die Zellsuspension wurde aufgenommen und 5 min bei 248×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Erythrozytenlyse in 3 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 3 min inkubiert. Es wurden 12 mL PBS zugegeben und die Suspension über ein 70 µm Zellsieb filtriert und 5 min bei 248×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL PBS resuspendiert und diese Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung (siehe Kap. 4.4) eingesetzt.

4.3.2 Aufarbeitung von Lymphozyten aus der Leber

Vor Entnahme der Leber aus der Maus, wurde die Leber über die Portalvene mit 5 mL PBS perfundiert. Die Gallenblase wurde entfernt. Die Leber wurde in 20 mL PBS aufgenommen und zusammen mit dem PBS auf ein Metallsieb in eine Petrischale gegeben. Mit dem Kolben einer Spritze wurde die Leber in dem Sieb zerdrückt und homogenisiert. Das Sieb wurde mit 20 mL PBS gespült und die Zellsuspension über ein 70 μm Zellsieb filtriert. Die filtrierte Zellsuspension wurde 5 min bei 248 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL 40 % *Percoll Separating Solution* in RPMI Medium aufgenommen und auf 3 mL 70 % *Percoll Separating Solution* in RPMI Medium geschichtet. Dieser Gradient wurde 20 min bei 524 \times g ohne Bremse zentrifugiert. Der obere rosafarbige Ring, der Zelltrümmer und Hepatozyten enthält, wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Lymphozyten in der Interphase wurden in ein 50 mL Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und es wurde 5 min bei 248 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse in 3 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 3 min inkubiert. Es wurden 12 mL PBS zugegeben und 5 min bei 248 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Residualvolumen resuspendiert und diese Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung (siehe Kap. 4.4) eingesetzt.

4.3.3 Aufarbeitung von Lymphozyten aus dem Lymphknoten

Ein inguinaler Lymphknoten wurde aus der Maus entnommen und in 5 mL PBS aufgenommen. Am Binokular (Stereomikroskop) wurde mit Hilfe von Pinzetten überschüssiges Fettgewebe entfernt ohne den Lymphknoten zu verletzen. Der Lymphknoten wurde zusammen mit dem PBS auf ein Metallsieb in eine Petrischale gegeben. Mit dem Kolben einer Spritze wurde der Lymphknoten in dem Sieb zerdrückt und homogenisiert. Das Sieb wurde mit 10 mL PBS gespült, die Zellsuspension wurde über ein 70 μm Zellsieb filtriert und 5 min bei 248 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Residualvolumen resuspendiert und diese Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung (siehe Kap. 4.4) eingesetzt.

4.3.4 Aufarbeitung von Lymphozyten aus der Lunge

Vor Entnahme der Lunge aus der Maus, wurde die Lunge über die rechte Herzkammer mit 10 mL PBS perfundiert. Die Lunge wurde mit Hilfe einer Schere in kleine Stücke zerschnitten und 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in 20 mL komplettem RPMI Medium inklusive 0,25 mg/mL Kollagenase D, 0,25 mg/mL Kollagenase VIII und 10 Einheiten/mL DNase I verdaut. Die verdaute Lunge wurde zusammen mit dem Medium auf ein Metallsieb in eine Petrischale gegeben. Mit dem Kolben einer Spritze wurde die zerschnittene, verdaute Lunge in dem Sieb zerdrückt und homogenisiert. Das Sieb wurde mit 20 mL PBS gespült und die Zellsuspension über ein 70 μm Zellsieb filtriert. Die filtrierte Zellsuspension wurde 5 min bei 248 \times g zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse in 3 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 3 min inkubiert. Es wurden 12 mL PBS zugegeben und 5 min bei 248×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL PBS resuspendiert und diese Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung (siehe Kap. 4.4) eingesetzt.

4.3.5 Aufarbeitung von Lymphozyten aus dem Knochenmark

Das Fell wurde von einem Hinterbein entfernt. Der Oberschenkelknochen wurde aus dem Beckenboden gelöst und am Knie vom Unterschenkel getrennt. Der Oberschenkelknochen wurde von Muskelgewebe befreit, an beiden Seiten mit einer Schere durchtrennt und das Knochenmark mit 5 mL PBS aus dem Knochen gespült. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 248×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Erythrozytenlyse in 3 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 3 min inkubiert. Es wurden 12 mL PBS zugegeben und die Suspension über ein 70 µm Zellsieb filtriert und 5 min bei 248×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL PBS resuspendiert und diese Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung (siehe Kap. 4.4) eingesetzt.

4.3.6 Aufarbeitung von Lymphozyten aus dem Blut

Aus der rechten Herzkammer wurde mit Hilfe einer in Heparin-Lösung getauchten Kanüle Blut entnommen und mit 25 µL Heparin-Lösung gemischt. 100 µL dieser Blut-Heparin-Lösung wurden zur Erythrozytenlyse mit 1 mL *BD FACSTM Lysing Solution* gemischt und 3 min inkubiert. Es wurden 5 mL PBS zugegeben und 5 min bei 248×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

4.4 Zellzahlbestimmung

Die Dichte der Zellen in einer Zellsuspension kann mittels eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt werden. Dazu wurde die Oberfläche der Zählkammer gereinigt und das dazugehörige, leicht angefeuchtete Deckglas auf die Zählkammer gelegt. 10 µL der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl in 90 µL Trypan-Blau verdünnt und mit einer Pipette am Rand der Zählkammer in die Zählkammer pipettiert. In mindestens zwei der vier großen Quadrate wurden die Zellen gezählt und der Mittelwert \bar{x} berechnet. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgt nach Formel (4.1).

$$\bar{x} = x \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnung} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (4.1)$$

4.5 Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)

Für die Isolierung von CD8⁺ T-Zellen aus einer Zellsuspension wurde die MACS (*magnetic-associated cell sorting*) Technologie von Miltenyi Biotech verwendet. Das Prinzip der MACS Technologie besteht darin, dass bestimmte Zellen einer Zellsuspension magnetisch markiert und über eine Säule in einem Magneten isoliert werden. Der Durchfluss enthält nicht-markierte Zellen, während das Eluat die magnetisch markierten Zellen beinhalten. Die indirekte magnetische Markierung basiert auf zwei Schritten. Im ersten Schritt werden die Zellen mit einem primären Antikörper, der gegen Oberflächenmoleküle gerichtet ist, markiert. Im zweiten Schritt werden die Zellen mit *MACS MicroBeads* magnetisch markiert. *MACS MicroBeads* binden entweder direkt an den primären Antikörper oder an ein Molekül, das mit dem primären Antikörper assoziiert ist. Um Zielzellen unmarkiert zu isolieren, werden nicht-Zielzellen magnetisch markiert und depletiert. Während der Trennung werden die unmarkierten Zielzellen im Durchfluss gesammelt. Die magnetisch markierten Zellen bleiben in der Säule und können bei Bedarf nach Entfernen der Säule aus dem Magneten eluiert werden.

Lymphozyten wurden aus der Milz standardmäßig (siehe Kap. 4.3.1), jedoch steril, aufgearbeitet. Es wurde eine extrazelluläre FACS-Färbung (siehe Kap. 4.7.1) durchgeführt. Dazu wurden pro Milz 5 µL der folgenden FITC-markierten Antikörper verwendet.

Spezifität	Zellpopulation
CD11b	Myeloide Zellen
CD19	B-Zellen
F4/80	Makrophagen
MHC II	Dendritische Zellen und B-Zellen
CD4	CD4 ⁺ T-Zellen

Die Zellsuspension wurde mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,2 % BSA (Bovines Serumalbumin) in PBS gewaschen und 1×10^7 Zellen in 80 µL 0,2 % BSA in PBS resuspendiert. Pro 1×10^7 Zellen wurden 5 µL α -FITC *MACS MicroBeads* zugegeben und 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 0,2 % BSA in PBS gewaschen und in 500 µL 0,2 % BSA in PBS resuspendiert. Die *MACS Separationsäule* (LD-Säule) wurde mit 2 mL 0,2 % BSA in PBS äquilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und zwei Mal mit 1 mL 0,2 % BSA in PBS gespült. Die Säule wurde aus dem Magneten entfernt und die magnetisch markierten Zellen mit 3 mL 0,2 % BSA in PBS eluiert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde eine FACS-Messung durchgeführt.

4.6 Stimulation von T-Zellen

4.6.1 *In vitro* Stimulation

Die Stimulation der T-Zellen erfolgte in FACS-Röhrchen. Es wurden 2×10^6 Zellen in 100 μL PBS pro Ansatz vorgelegt. Für jede Probe wurden drei Ansätze vorbereitet. Der erste Ansatz diente als Referenzwert und enthielt keine stimulierenden Substanzen. Zu dem zweiten Ansatz wurde PMA/Iono gegeben. PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) wird auch als TPA (*12-O-Tetradecanylphorbol-13-acetate*) bezeichnet und aktiviert die Proteinkinase C aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem natürlichen Aktivator Diacylglycerol. Iono (*Ionomycin*) ist ein Ionophor, also ein Lipid-lösliches Molekül, welches den Transport von Ionen über Lipid-Doppelschichten und Zellmembranen vermittelt. Die Zugabe von Ionomycin zu Zellen bewirkt eine Steigerung des intrazellulären Calcium-Spiegels. Intrazelluläres Calcium bindet in T-Zellen an Calcineurin und führt zur Dephosphorylierung und Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*). NFAT ist ein zentraler Transkriptionsfaktor in der T-Zellaktivierung, der z.B. die Transkription verschiedener Interleukine kontrolliert. PMA und Iono dienten als unspezifische Stimulation der T-Zellen. Der dritte Ansatz enthielt die Peptide Listeriolysin O₁₈₉₋₂₀₁ (LLO₁₈₉₋₂₀₁) und Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ (OVA₂₅₇₋₂₆₄). LLO₁₈₉₋₂₀₁ aktiviert Listeriolysin-spezifische CD4⁺ T-Zellen, während OVA₂₅₇₋₂₆₄ Ovalbumin-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert. Diese Peptide stellen immundominante Epitope dar, die in C57BL/6 Mäusen starke T-Zellantworten induzieren. Die Stimulation erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 1 mL in komplettem RPMI Medium. Die folgende Tabelle zeigt in welchen Mengen die Stimulationssubstanzen eingesetzt wurden.

Stimulationssubstanz	Endkonzentration
PMA	50 ng/ μL
Iono	1 μM
LLO ₁₈₉₋₂₀₁	10^{-6} M
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	10^{-5} M

Nach Zugabe der Stimulationssubstanzen wurde 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurden pro Ansatz 1 μL Brefeldin A in 50 μL PBS (Endkonzentration: 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugegeben. Brefeldin A zerstört den Golgi-Apparat, wodurch neusynthetisierte Proteine nicht mehr exozytiert werden können und in der Zelle akkumulieren. Dadurch wird eine intrazelluläre Färbung der durch die Stimulationssubstanzen angeregten Syntheseprodukte ermöglicht. Es wurde weitere 3,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert [69, 70]. Die Zellsuspension wurde mit PBS gewaschen und standardmäßig extra- und intrazellulär gefärbt (siehe Kap. 4.7).

4.6.2 CXCL16 Stimulation

Die Stimulation der T-Zellen mit CXCL16 erfolgte in 48-Napfplatten. Es wurden 4×10^5 Zellen pro Napf in 400 μL komplettem RPMI Medium inklusive Stimulationssubstanz eingesetzt. Als Referenzwerte dienten ein Ansatz, der keine stimulierenden Substanzen enthielt, und ein Ansatz, der als Kontrolle für Aktivierung und Proliferation diente. Diese Positiv-Kontrolle enthielt aktivierende αCD3 und αCD28 Antikörper. CD3 ist ein Teil des T-Zellrezeptor-Komplexes. CD28 wird ebenfalls auf T-Zellen exprimiert und liefert kostimulatorische Signale. Als direkter Vergleich für die Stimulationseigenschaften von CXCL16 auf T-Zellen in Bezug auf Wachstum und Überleben wurde Interleukin-15 (IL-15) verwendet. IL-15 kontrolliert die Proliferation und das Überleben von Gedächtnis- CD8^+ -T-Zellen [71]. Die folgende Tabelle zeigt in welchen Mengen die Stimulationssubstanzen eingesetzt wurden.

Stimulationssubstanz	Endkonzentration
αCD3	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
αCD28	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
IL-15	3 ng/mL, 10 ng/mL, 30 ng/mL, 100 ng/mL, 300 ng/mL
CXCL16	3 ng/mL, 10 ng/mL, 30 ng/mL, 100 ng/mL, 300 ng/mL

Es erfolgte für jeden Ansatz eine Doppelbestimmung. Die Ansätze wurden für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 300 μL entnommen und standardmäßig extrazellulär gefärbt (siehe Kap. 4.7.1).

4.7 FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Färbung

Für die FACS-Färbungen wurden 2×10^6 Zellen in 100 μL PBS vorgelegt. Vor der FACS-Färbung muss die Oberfläche der Zellen blockiert werden, damit unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert werden. Pro Ansatz werden 1 μL NRS (Natives Rattenserum) und 0,5 μL F_c -Block in 50 μL PBS verdünnt und zu den Zellen gegeben. Die im Rattenserum enthaltenen Immunglobuline blockieren unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Oberfläche der Zellen. Der F_c -Block bindet spezifisch an CD16 und CD32 und blockiert die F_c -Rezeptoren. Dadurch wird verhindert, dass diese Rezeptoren den F_c -Teil der Antikörper binden. Es wurde gevortext und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

4.7.1 Extrazelluläre FACS-Färbung

Für die extrazelluläre FACS-Färbung wurden die gewünschten Antikörper pro Ansatz in 50 μL PBS verdünnt (ca. 0,1-1 $\mu\text{g}/\text{Ansatz}$), auf die Zellen gegeben, die Suspension gevortext und 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und entweder

direkt zur Messung eingesetzt, mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert oder intrazellulär gefärbt. Die Fixierung erfolgte durch Zusatz von 100 μ L 1 % PFA in PBS pro Ansatz. Die Zellen wurden mit der Fixierungssubstanz gemischt und bei 4 °C für max. drei Tage gelagert.

4.7.2 Intrazelluläre FACS-Färbung

Pro Ansatz wurden 200 μ L 2 % PFA in PBS zugegeben und die Suspension wurde 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit 0,2 % BSA in PBS gewaschen. Die intrazelluläre Blockierung erfolgte durch 1 μ L NRS und 0,5 μ L F_c-Block in 50 μ L Saponinpuffer. Es wurde 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Für die intrazelluläre FACS-Färbung wurden die gewünschten Antikörper pro Ansatz in 50 μ L Saponinpuffer verdünnt, auf die Zellen gegeben und die Suspension wurde 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und zur Messung eingesetzt oder fixiert. Die Fixierung erfolgte durch Zusatz von 100 μ L 1 % PFA in PBS pro Ansatz. Die Zellen wurden mit der Fixierungssubstanz gemischt und bei 4 °C für max. drei Tage gelagert.

4.8 Proliferationsbestimmung

Die Zellproliferation äußert sich in Zellteilung und Zellvermehrung. Als Nachweis von Proliferation diente einerseits die Färbung mit dem Zell-Proliferationsfarbstoffe eFluor 670 oder die Färbung von Ki-67 und andererseits die Einlagerung von BrdU in neu synthetisierte DNA. Der Zell-Proliferationsfarbstoff eFluor 670 wurde genutzt, um individuelle Zellteilungen zu detektieren. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet an zelluläre Proteine, die primäre Amine enthalten. Bei einer Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes halbiert sich dabei [72]. Die Expression von Ki-67 ist strikt mit der Zellproliferation assoziiert. Ki-67 ist während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) vorhanden, jedoch in ruhenden Zellen abwesend [73]. BrdU (Bromodeoxyuridine) ist ein Analogon des Nukleosids Thymidin und wird während der S-Phase des Zellzyklus in neu synthetisierte DNA eingelagert. Mit Hilfe von Fluorochrom-markierten spezifischen Anti-BrdU Antikörpern kann der Einbau von BrdU in die DNA und somit die Proliferation von Zellen nachgewiesen werden [74, 75].

4.8.1 Zell-Proliferationsfarbstoff eFluor 670

Für die Markierung der Zellen mit dem Proliferationsfarbstoff eFluor 670 wurden bis zu 5×10^7 Zellen in 900 μ L 0,2 % BSA in PBS resuspendiert und 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurden 100 μ L einer 50 μ M eFluor 670-Lösung zugegeben, gut gemischt und 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 0,2 % BSA in PBS gewaschen.

4.8.2 Ki-67

Für die Ki-67-Färbung wurden 2×10^6 Zellen in 100 μL PBS vorgelegt und standardmäßig extrazellulär gefärbt (siehe Kap. 4.7.1). Die Ki-67-Färbung erfolgte mit dem *FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set*. Die Zellen wurden in 200 μL *Fix/Perm Working Solution* resuspendiert und für 12 bis 18 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erst mit 0,2 % BSA in PBS und dann mit 200 μL Permeabilisierungspuffer gewaschen. Für die Färbung wurden pro Ansatz 20 μL des Ki-67 Antikörpers in 200 μL Permeabilisierungspuffer verdünnt, auf die Zellsuspension gegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Es wurde mit 1 mL Permeabilisierungspuffer gewaschen und die Zellen wurden für die FACS-Messung in PBS resuspendiert.

4.8.3 Bromdesoxyuridin (BrdU)

Einen Tag vor der Entnahme der Organe aus der Maus wurde dieser 1 mg BrdU intraperitoneal injiziert. Am Versuchstag wurden die Organe entnommen und Lymphozyten isoliert (siehe Kap. 4.3). Die extrazelluläre FACS-Färbung erfolgte standardmäßig (siehe Kap. 4.7.1). Die BrdU-Färbung erfolgte mit Hilfe des *APC BrdU Flow Kit* von BD Pharmingen. Die Zellen wurden mit 1 mL Färbepuffer gewaschen, in 100 μL *BD Cytofix/Cytoperm* resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Es wurde mit 1 mL *BD Perm/Wash Puffer* gewaschen. An dieser Stelle des Protokolls war es möglich die Zellen über Nacht bei 4 °C zu lagern. Die Zellen wurden in 100 μL *Cytofix/Cytoperm*^{PLUS} resuspendiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Es wurde mit 1 mL *BD Perm/Wash Puffer* gewaschen, die Zellen in 100 μL *Cytofix/Cytoperm* resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 mL *BD Perm/Wash Puffer* gewaschen. 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase in 100 μL PBS wurden auf die Zellen gegeben und die Suspension 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Es wurde mit 1 mL *BD Perm/Wash Puffer* gewaschen. Die BrdU-Färbung erfolgte mit 1 μL Antikörper verdünnt in 50 μL *BD Perm/Wash Puffer* für 20 min bei RT. Die Zellen wurden mit *BD Perm/Wash Puffer* gewaschen und für die FACS-Messung in Färbepuffer resuspendiert.

4.9 Apoptosebestimmung

Der programmierte Zelltod wird als Apoptose bezeichnet. Er wird durch die Zelle selbst reguliert und führt zur Phagozytose der apoptotischen Zellen ohne eine inflammatorische Immunantwort auszulösen. Als Nachweis von Apoptose diente einerseits die Bindung von Annexin V an die apoptotische Zelle und andererseits der Nachweis von aktivierten Caspasen mit der FLICA (*Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases*) Färbung. Während der Apoptose transferieren Zellen Phosphatidylserin von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran. Diese Eigenschaft wird sich bei der Apoptosebestimmung zu Nutze gemacht, denn das Protein Annexin V bindet in Abhängigkeit von Calcium an Phosphatidylserin [76]. Ein

weiteres entscheidendes apoptotisches Ereignis ist die Aktivierung von Caspasen. FLICA sind Fluorochrom-gekoppelte Caspaseinhibitoren. Diese kurzen Peptide können die Zellmembran leicht durchdringen und im Zellinneren irreversibel an die katalytischen Zentren von aktivierten Caspasen binden [77].

4.9.1 Annexin V

Für die Annexin V-Färbung wurden 2×10^6 Zellen zwei Mal mit 1 mL Annexin V-Puffer gewaschen. Die Blockierung und extrazelluläre FACS-Färbung erfolgte standardmäßig (siehe Kap. 4.7.1), jedoch nicht in PBS, sondern in Annexin V-Puffer. Es wurde mit 1 mL Annexin V-Puffer gewaschen und die Zellen für die FACS-Messung in Annexin V-Puffer resuspendiert.

4.9.2 Fluoreszenz markierte Inhibitoren von Caspasen (FLICA)

Für die FLICA (*Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases*) Färbung wurden 2×10^6 Zellen standardmäßig extrazellulär gefärbt (siehe Kap. 4.7.1). Die FLICA-Färbung erfolgte mit Hilfe des *SR-FLICA™ in vitro Poly Caspases Kit* von ImmunoChemistry Technologies. Die Zellen wurden in 300 μ L PBS resuspendiert und 10 μ L 30 x FLICA-Stock hinzugegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurde gemischt. Es wurde 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 2 mL *Wash Puffer* gewaschen. Es wurde gevortext, mit 1 mL *Wash Puffer* gewaschen und die Zellen wurden für die FACS-Messung in *Wash Puffer* resuspendiert.

4.10 FACS-Messung

4.10.1 Durchflusszytometrie

Das FACS ermöglicht die Untersuchung und Unterscheidung von Zellen anhand von Oberflächenmolekülen. Die Zellen werden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und im Durchflussverfahren durch verschiedene Laser angeregt. Für jede einzelne Zelle wird das nur leicht gebrochene Durchlicht (FSC, *Forward Scatter*) und das seitliche Streulicht (SSC, *Side Scatter*) detektiert. Zusätzlich wird die Fluoreszenzintensität der an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome bestimmt. Durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind, lässt sich die Expressionsstärke verschiedener Proteine auf individuellen Zellen analysieren.

4.10.2 FACS-Messung und Auswertung der FACS-Ergebnisse

In Abbildung 4.2 ist die verwendete *Gating*-Strategie zur Identifizierung von singulären, lebenden Lymphozyten gezeigt. Zu Beginn wurden die Zellen im FSC-A/SSC-A-*Dot Plot* dargestellt. Diese Darstellung enthält Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen.

In dieser Darstellung können die Lymphozyten identifiziert werden. Durch das Setzen einer Region um die Lymphozyten können Zelltrümmer und Erythrozyten von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden (Abb. 4.2 A). Im nächsten Schritt wurden die Zellen im FSC-A/FSC-H-*Dot Plot* dargestellt. In dieser Darstellung können durch das Setzen einer Region um singuläre Zellen, Dubletten ausgeschlossen werden (Abb. 4.2 B). Im letzten Schritt vor der eigentlichen Auswertung wurden die Zellen gegen einen lebend/tot-Farbstoff aufgetragen, um tote Zelle von der weiteren Analyse auszuschließen (Abb. 4.2 C und D). Als lebend/tot-Farbstoff wurde AF-750 Succinimidyl Ester oder Dapi (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) verwendet. Succinimidyl Ester reagieren mit freien Aminen. Lebende Zellen reagieren mit Succinimidyl Estern nur über Proteine auf ihrer Oberfläche, wodurch ein schwaches Fluoreszenzsignal entsteht. Tote Zellen hingegen haben defekte Zellmembranen, wodurch der Farbstoff ins Zellinnere gelangt und mit dem gesamten Zellinhalt reagiert. Dadurch entsteht ein stärkeres Fluoreszenzsignal. Dapi lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an. Nur bei toten Zellen mit defekter Zellmembran hat Dapi die Möglichkeit die DNA zu erreichen und an sie zu binden.

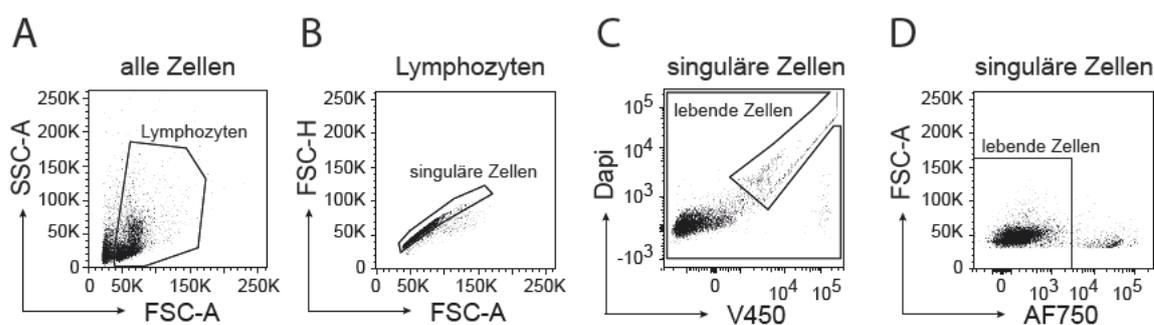


Abbildung 4.2: FACS Gating-Strategie: Identifizierung von singulären, lebenden Lymphozyten. (A) Im FSC-A/SSC-A-*Dot Plot* wurden Lymphozyten identifiziert und Zelltrümmer und Erythrozyten ausgeschlossen. (B) Im nächsten Schritt wurden im FSC-A/FSC-H-*Dot Plot* singuläre Zellen erfasst und Dubletten aus der nachfolgenden Auswertung eliminiert. (C und D) Zuletzt wurde tote Zellen entfernt. (C) V450 wurde gegen Dapi aufgetragen und doppelpositive Signale als tote Zellen identifiziert und ausgeschlossen oder (D) AF750 wurde gegen FSC-A aufgetragen und AF750⁺ Signale als tote Zellen identifiziert und aus der nachfolgenden Auswertung ausgeschlossen.

Anschließend erfolgte die Darstellung der verschiedenen verwendeten Fluorochrome gegeneinander. Da die Emissionswellenlängen einiger Fluorochrome überlappen musste eine Kompensation durchgeführt werden, um falsch positive Signale auszuschließen. Für die Kompensation wurde pro verwendetem Fluorochrom ein Ansatz vorbereitet. Dieser Ansatz enthielt Zellen, die mit einem Antikörper markiert wurden, der an das entsprechende Fluorochrom gekoppelt war. Zusätzlich wurden auch unmarkierte Zellen gemessen. Die für die Kompensation verwendeten Fluorochrom-gekoppelten-Antikörper sollten gegen stark ausgeprägte Oberflächenmoleküle wie CD4 oder CD8 gerichtet sein. Mit Hilfe dieser Färbungen konnten falsch positive Signale von den positiven Signalen unterschieden und abgezogen werden. Die *BD FACS-*

Diva Software des *FACS Canto II* ermöglichte eine automatische Kompensation, die manuell "nachkompensiert" werden konnte. Für die Auswertung der FACS-Daten wurde die *FlowJo* Software verwendet.

4.11 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der *GraphPad Prism* Software durchgeführt. Um signifikante Unterschiede zu bestimmen wurden verschiedene Tests angewandt. Für Experimente mit zwei Gruppen wurde der t-Test oder der Mann-Whitney Test (Vergleich der Bakterienbelastungen) verwendet. Die Signifikanzen von Experimenten mit drei oder mehr Gruppen wurden mit der *one-way analysis of variance* (ANOVA) mit Dunnett-Post Test berechnet. Ein Unterschied wurde als signifikant bewertet, wenn $p < 0,05$ war.

5 Ergebnisse

5.1 Expression des Chemokinrezeptors CXCR6

Zur Untersuchung der extrazellulären Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 wurden Reporter-mäuse (CXCR6^{+/GFP} Mäuse) mit 1×10^4 *Listeria monocytogenes* OVA (*LmOVA*) intravenös (iv) infiziert. Als Kontrolle dienten CXCR6^{+/GFP} Mäuse, die nicht infiziert wurden. Listerien infizieren in der Maus bevorzugt Milz und Leber [2]. An Tag 2, Tag 5, Tag 7, Tag 9 und Tag 14 nach Infektion wurden Milz und Leber entnommen, Lymphozyten gereinigt und CD8⁺ T-Zellen, aktivierte CD8⁺ T-Zellen und Interferon- γ (IFN- γ) produzierende CD8⁺ T-Zellen auf ihre CXCR6-Expression untersucht. An Tag 8 bis Tag 10 nach Infektion hat die T-Zellantwort im Mausmodell normalerweise ihr Maximum erreicht [2, 5]. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen wurden als CD44⁺ CD62L⁻ definiert. Die isolierten CD8⁺ T-Zellen wurden *in vitro* mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ restimuliert (siehe Kap. 4.6.1). Durch diese Peptidstimulation können Listerien- bzw. OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen und zur Produktion von Zytokinen wie IFN- γ angeregt werden.

5.1.1 Expression von CXCR6 auf CD8⁺ T-Zellen

In Abbildung 5.1 ist die Kinetik der CXCR6-Expression von CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Leber nach iv Infektion von CXCR6^{+/GFP} Mäusen mit *LmOVA* dargestellt. Im Verlauf der Infektion kam es an Tag 2 zu einer leichten Reduktion des prozentualen Anteils (Abb. 5.1 A) und der absoluten Zahl (Abb. 5.1 B) der CD8⁺ T-Zellen. Bis Tag 7 stieg der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Zellen in der Milz auf ca. 20 % und in der Leber auf mehr als 30 % an. Im weiteren Verlauf der Infektion nahm der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber langsam ab (Abb. 5.1 A). Die absolute Zahl an CD8⁺ T-Zellen erreichte ihr Maximum in der Milz an Tag 5 und blieb auf diesem hohen Level von ca. $1,5 \times 10^7$ Zellen bis Tag 9 nach Infektion. Danach begann die Zellzahl wieder zu sinken. In der Leber erreichte die absolute Zahl an CD8⁺ T-Zellen mit ca. $1,2 \times 10^6$ Zellen erst an Tag 7 ihr Maximum. Bis Tag 9 nach Infektion sank die Zahl bereits wieder (Abb. 5.1 B).

Die CXCR6-Expression auf CD8⁺ T-Zellen nahm im Verlauf der Infektion mit *LmOVA* in Milz und Leber zu. In Milz und Leber von naiven Mäusen exprimierten ca. 20 % der CD8⁺ T-Zellen CXCR6. Bis Tag 9 erhöhte sich dieser Anteil in der Leber auf mehr als 60 %. In der Milz war nach der Infektion eine kontinuierliche Zunahme des Anteils an CD8⁺ T-Zellen, die CXCR6 exprimierten, zu beobachten. An Tag 14 waren fast 40 % der CD8⁺ T-Zellen CXCR6-positiv

(Abb. 5.1 C). In Abbildung 5.1 D ist eine beispielhafte Darstellung der CXCR6-Expression auf CD8⁺ T-Zellen gezeigt.

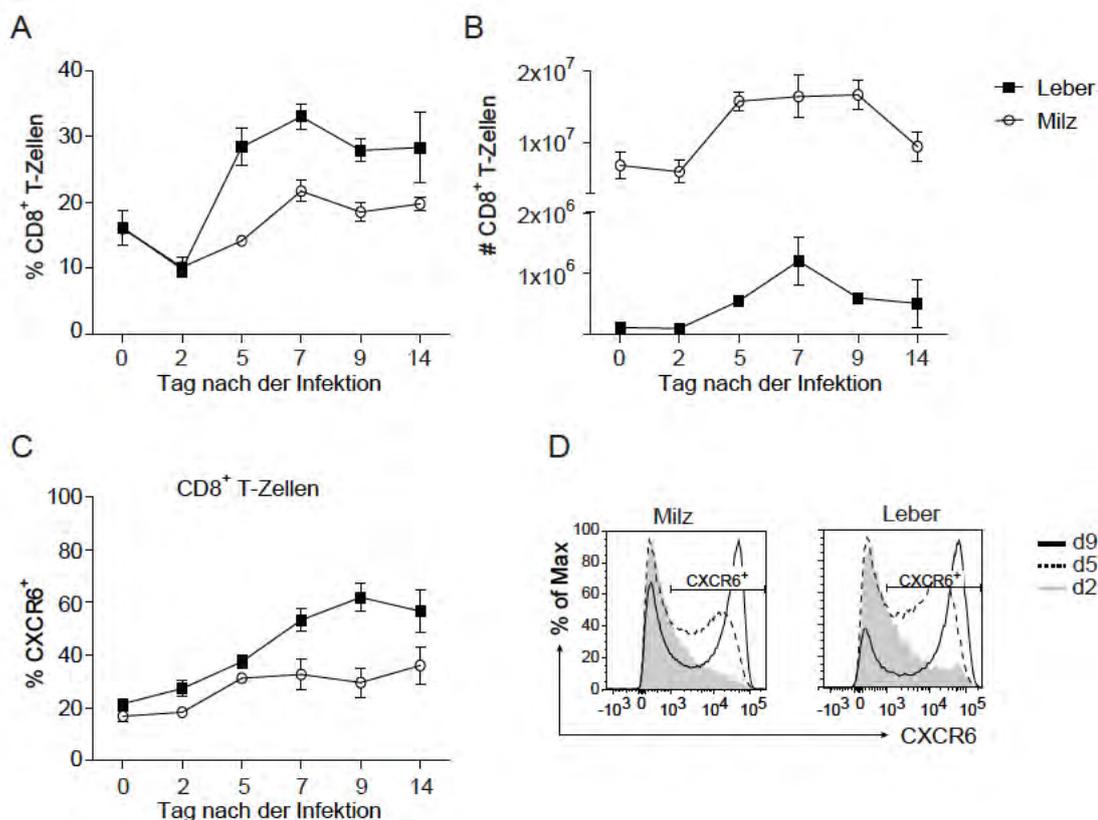


Abbildung 5.1: Expression von CXCR6 auf CD8⁺ T-Zellen nach *LmOVA* Infektion. CXCR6⁺/GFP Mäuse wurden mit 1×10^4 *LmOVA* iv infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Milz und Leber entnommen und Lymphozyten gereinigt. Die Symbole stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$) dar. (A) Prozentualer Anteil an CD8⁺ T-Zellen von den Lymphozyten. (B) Absolute Anzahl an CD8⁺ T-Zellen. (C) Prozentualer Anteil an CXCR6-exprimierenden CD8⁺ T-Zellen. (D) Beispielhafte Darstellung der CXCR6-Expression auf CD8⁺ T-Zellen in einem Histogramm.

Das Maximum der CD8⁺ T-Zellantwort nach Infektion von Mäusen mit *LmOVA* wurde ca. sieben Tage nach Infektion erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war der prozentuale Anteil und die Zahl der CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber am größten. Der Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR6 exprimierten, stieg in der Milz kontinuierlich an und erreichte in der Leber an Tag 9 nach Infektion seinen höchsten Wert. Obwohl die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 auf CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der Listerieninfektion zunimmt, stimmen die Kinetik der CD8⁺ T-Zellen und die Kinetik der Expression von CXCR6 auf CD8⁺ T-Zellen nicht direkt überein. Während das Maximum der CD8⁺ T-Zellantwort ca. sieben Tage nach Infektion erreicht wurde, war die Induktion von CXCR6 verzögert und erreichte ihr Maximum erst ab Tag 9 nach Infektion. Die Expression von CXCR6 auf CD8⁺ T-Zellen wird durch die Listerieninfektion verstärkt, die Kinetik der CXCR6 Expression auf CD8⁺ T-Zellen ist jedoch

verglichen mit der CD8⁺ T-Zellantwort verzögert.

5.1.2 Expression von CXCR6 auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen

Um die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 auf CD8⁺ T-Zellen direkt mit der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen während einer Infektion mit *LmOVA* zu korrelieren wurden aktivierte CD8⁺ T-Zellen untersucht. In Abbildung 5.2 ist die Kinetik der CXCR6-Expression von aktivierten CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Leber nach iv Infektion von CXCR6^{+/GFP} Mäusen mit *LmOVA* dargestellt. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen wurden als CD44⁺CD62L⁻ definiert. CD44 ist ein Adhäsionsmolekül und wird auf Effektor- und Gedächtniszellen exprimiert. Es vermittelt Zell-Zellinteraktionen und Migrationsprozesse [78]. CD62L wird auch als L-Selektin bezeichnet und ist ebenfalls ein Adhäsionsmolekül. Lymphozyten benötigen CD62L auf ihrer Oberfläche um in sekundäre lymphatische Organe zu gelangen. Naive CD8⁺ T-Zellen und zentrale CD8⁺ T-Gedächtniszellen exprimieren CD62L, damit sie in sekundäre lymphatische Organe einwandern können. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen und Effektor-CD8⁺ T-Gedächtniszellen exprimieren kein CD62L. Sie zirkulieren außerhalb der Lymphorgane und üben dort ihre Effektorfunktionen aus [9].

Im Verlauf der Infektion kam es zu einer starken Zunahme des Anteils an aktivierten CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber. In der Milz stieg der Anteil an aktivierten CD8⁺ T-Zellen bis Tag 7 auf ca. 50 % an. Bis Tag 14 nahm der Anteil an aktivierten CD8⁺ T-Zellen wieder ab. In der Leber zeigten mehr als 70 % der CD8⁺ T-Zellen an Tag 7 und Tag 9 einen aktivierten Phänotyp. Wie in der Milz nahm auch in der Leber der Anteil an aktivierten CD8⁺ T-Zellen bis Tag 14 nach Infektion wieder ab (Abb. 5.2 A).

Der Anteil an aktivierten CD8⁺ T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR6 exprimierten, nahm bis Tag 2 nach Infektion in Milz und Leber leicht ab. Im weiteren Verlauf der Infektion erhöhte sich der Anteil an CXCR6-exprimierenden aktivierten CD8⁺ T-Zellen in der Milz stark und in der Leber leicht. In der Milz von naiven Mäusen exprimierten ca. 35 % der aktivierten CD8⁺ T-Zellen CXCR6. Bis Tag 14 nach Infektion stieg dieser Anteil auf mehr als 50 % an. In der Leber von naiven Mäusen hingegen exprimierten bereits ca. 80 % der aktivierten CD8⁺ T-Zellen den Chemokinrezeptor CXCR6. Bis Tag 14 erhöhte sich der Anteil an CXCR6-exprimierenden aktivierten CD8⁺ T-Zellen auf ca. 90 % (Abb. 5.2 B). In Abbildung 5.2 C ist eine beispielhafte Darstellung der Expression von CD44 und CD62L auf CD8⁺ T-Zellen gezeigt.

Wie schon in Abschnitt 5.1.1 gezeigt werden konnte, wurde das Maximum der CD8⁺ T-Zellantwort nach Infektion von Mäusen mit *LmOVA* ca. sieben Tage nach Infektion erreicht. Zu diesem Zeitpunkt und an Tag 9 nach Infektion war der Anteil an aktivierten CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber am größten. Der Anteil an CXCR6-exprimierenden aktivierten CD8⁺ T-Zellen stieg nach einer leichten Senkung an Tag 2 in Milz und Leber kontinuierlich an. Es ist zu beachten, dass der Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die CXCR6 exprimierten, in der Leber auffällig hoch war. Die Kinetik von aktivierten CD8⁺ T-Zellen und die Kinetik der Expression von CXCR6 auf

aktivierten CD8⁺ T-Zellen stimmen nicht direkt überein. Obwohl die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der Listerieninfektion vor allem in der Milz stark zunimmt und in der Leber von naiven Tieren schon sehr hoch ist, korrelieren die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und deren Expression von CXCR6 nicht direkt miteinander. Die Expression von CXCR6 auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen wird durch die Listerieninfektion verstärkt, die Kinetik der CXCR6 Expression auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen ist jedoch verglichen mit der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen verzögert.

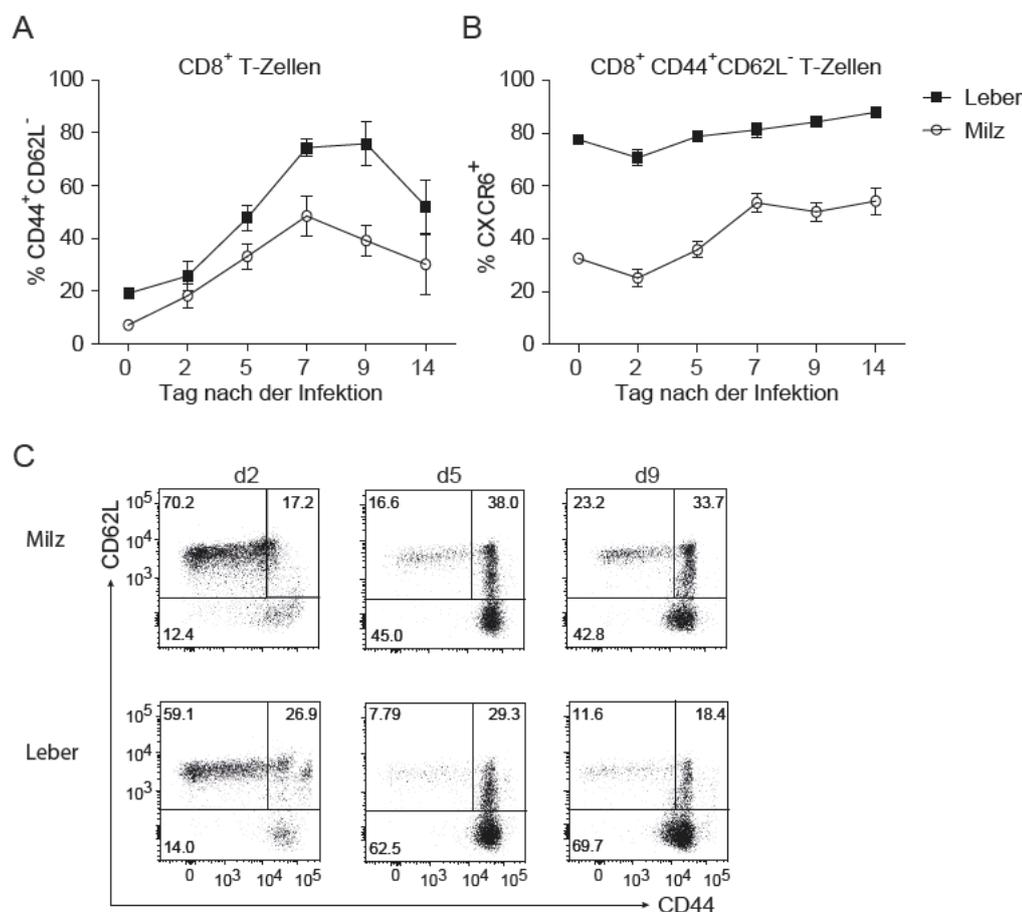


Abbildung 5.2: Expression von CXCR6 auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen nach *LmOVA* Infektion. CXCR6^{+/GFP}Mäuse wurden mit 1×10^4 *LmOVA* iv infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Milz und Leber entnommen und Lymphozyten gereinigt. Die Symbole stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$) dar. (A) Prozentualer Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die CD44-positiv und CD62L-negativ sind. (B) Prozentualer Anteil an CXCR6-exprimierenden CD44⁺CD62L⁻ CD8⁺ T-Zellen. (C) Beispielhafte Darstellung der Expression von CD44 und CD62L auf CD8⁺ T-Zellen in *Dot-Plots*. In den Regionen sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben.

5.1.3 Expression von CXCR6 auf Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde bei CD8⁺ T-Zellen ein Zusammenhang zwischen der Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 und der Produktion des Zytokins IFN- γ un-

tersucht (Abbildung 5.3). Hierbei wurde die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen als Maß für die Anzahl Listerien-spezifischer CD8⁺ T-Zellen genutzt. In C57BL/6 Mäusen konnte bisher kein Listerien-spezifisches immundominantes Peptid für CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Der Listerienstamm *LmOVA* sekretiert in der infizierten Zelle eine verkürzte Form des Ovalbumins, das zu OVA₂₅₇₋₂₆₄ prozessiert und über MHC I als immundominantes Peptid auf der Zelloberfläche präsentiert wird. *LmOVA*-spezifische CD8⁺ T-Zellen erkennen das auf MHC I präsentierte OVA-Peptid und es kommt zu einer T-Zell-Rezeptor-spezifischen Aktivierung der T-Zellen. *In vitro* werden die isolierten Lymphozyten mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid stimuliert und anhand der IFN- γ Produktion können dann Listerien-spezifische CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Die Kombination der *LmOVA* Infektion mit der *in vitro* Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit dem immundominanten Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (siehe Kap. 4.6.1) ermöglicht über die Identifizierung IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Zellen die Beobachtung einer Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort.

Die Produktion von IFN- γ durch CD8⁺ T-Zellen, also die Anzahl Listerien-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, nahm im Verlauf der Infektion in Milz und Leber zu. In der Milz produzierten an Tag 7 ca. 5 % der CD8⁺ T-Zellen IFN- γ . Danach nahm der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen wieder ab. In der Leber war der Anteil der Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen weitaus größer. An Tag 7 und Tag 9 nach Infektion waren fast 15 % der CD8⁺ T-Zellen IFN- γ -positiv. Bis Tag 14 sank der Anteil an IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen in der Leber wieder auf unter 5 % ab (Abb. 5.3 A).

Der Anteil an IFN- γ ⁺ Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR6 exprimierten, stieg im gesamten Verlauf der Infektion an. Der Anteil an CXCR6-exprimierenden CD8⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten, lag an Tag 5 nach Infektion in Milz und Leber bei ca. 50 %. Dieser Anteil vergrößerte sich bis Tag 14 auf fast 80 %. Obwohl an Tag 14 der Anteil an Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wieder vermindert war, stieg der Anteil an CXCR6-exprimierenden IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen weiter an (Abb. 5.3 B). Abbildung 5.3 C zeigt eine beispielhafte Darstellung der Expression von CD44 und CD62L auf CD8⁺ T-Zellen.

Wie schon in Abschnitt 5.1.1 und 5.1.2 beschrieben ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 nicht direkt mit der CD8⁺ T-Zellantwort nach Listerieninfektion korreliert. Der Anteil an Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erreichte an Tag 7 bis 9 nach Infektion sein Maximum, während die Expression von CXCR6 auf Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verzögert war und bis Tag 14 nach Infektion anstieg.

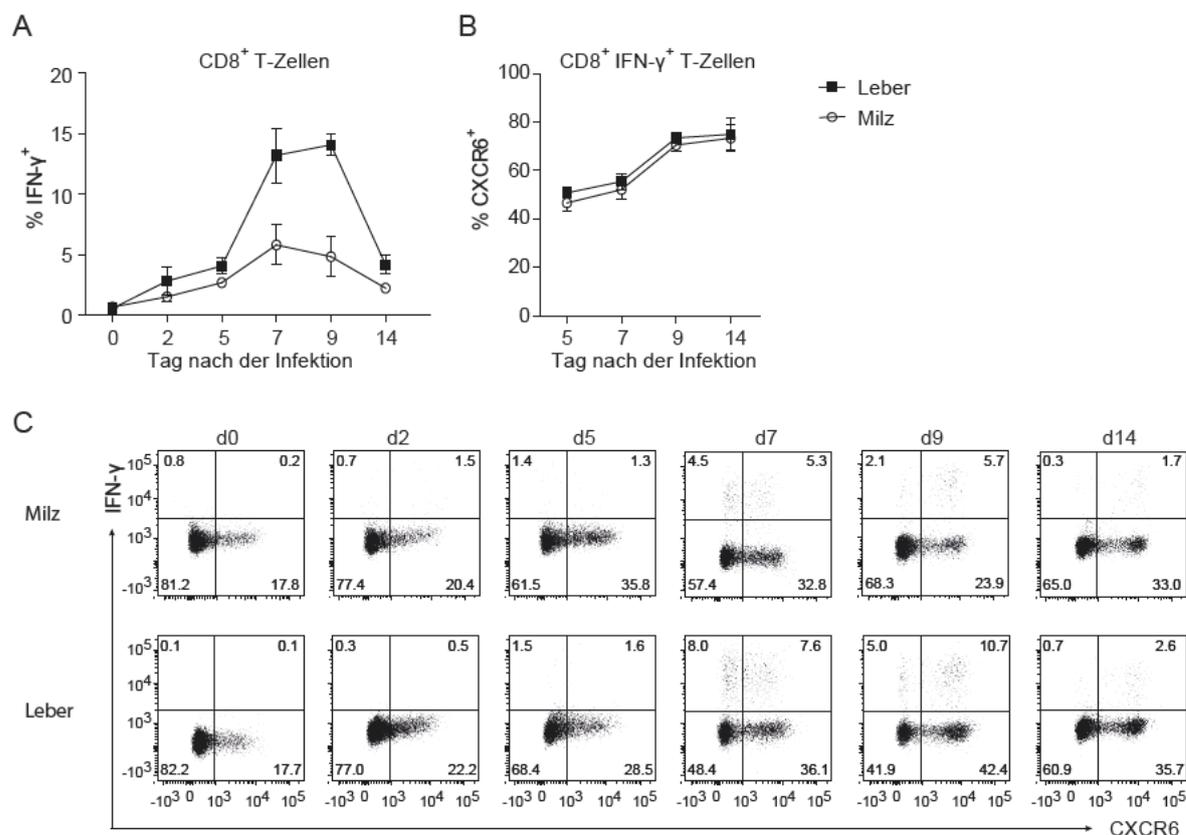


Abbildung 5.3: Expression von CXCR6 auf Listerien-spezifischen IFN- γ produzierenden $CD8^+$ T-Zellen nach *LmOVA* Infektion. CXCR6 $^{+/GFP}$ Mäuse wurden mit 1×10^4 *LmOVA* iv infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Milz und Leber entnommen und Lymphozyten gereinigt. Die Symbole stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$) dar. (A) Prozentualer Anteil an Listerien-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen (B) Prozentualer Anteil an CXCR6-exprimierenden IFN- γ^+ $CD8^+$ T-Zellen. Vor Tag 5 konnte keine Population an spezifischen $CD8^+$ T-Zellen gemessen werden. (C) Beispielhafte Darstellung der Expression von CXCR6 und IFN- γ auf $CD8^+$ T-Zellen in *Dot-Plots*. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die T-Zellantwort zwischen Tag 7 und Tag 9 nach Infektion ihr Maximum erreichte. Dies ist deutlich an dem Anteil und der Zahl von $CD8^+$ T-Zellen zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil an aktivierten und Listerien-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen am größten. Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 korrelierte nicht direkt mit dem Verlauf der $CD8^+$ T-Zellantwort. Der Anteil aller untersuchten $CD8^+$ T-Zellpopulationen, die CXCR6 exprimierten, begann immer mit einem niedrigen Wert und stieg kontinuierlich bis Tag 14, dem Ende unserer Untersuchungen, an. Die CXCR6-Expression war verglichen mit der $CD8^+$ T-Zellantwort verzögert. In der Leber war der Anteil der CXCR6-exprimierenden $CD8^+$ T-Zellen und der Anteil der CXCR6-exprimierenden aktivierten $CD8^+$ T-Zellen deutlich höher als in der Milz. Dies deutet darauf hin, dass der Chemokinrezeptor CXCR6 in der Leber eine größere Rolle spielt, als in der Milz.

5.2 Bakterienbelastung in CXCR6^{GFP/GFP} Mäusen

Für die Untersuchung der generellen Relevanz von CXCR6 für die Klärung von Listerien-Infektionen im Mausmodell wurden Mäuse mit Listerien infiziert und die Bakterienbelastung in Milz und Leber analysiert. Die initiale Kontrolle einer Infektion mit Listerien erfolgt durch das angeborene Immunsystem. Für die abschließende Eliminierung der Listerien sind jedoch T-Zellen, insbesondere CD8⁺ T-Zellen, essentiell [2]. Um zu prüfen, ob eine CXCR6-Defizienz zu einer verminderten Kontrolle von Listerien-Infektionen führt, wurden Wildtyp- und CXCR6-defiziente C57BL/6 Mäuse mit 1×10^4 *Listeria monocytogenes* EGD (*Lm*EGD) iv infiziert. An Tag 3, Tag 5 und Tag 7 nach Infektion wurden Milz und Leber entnommen und die Bakterienlast mittels serieller Titration bestimmt.

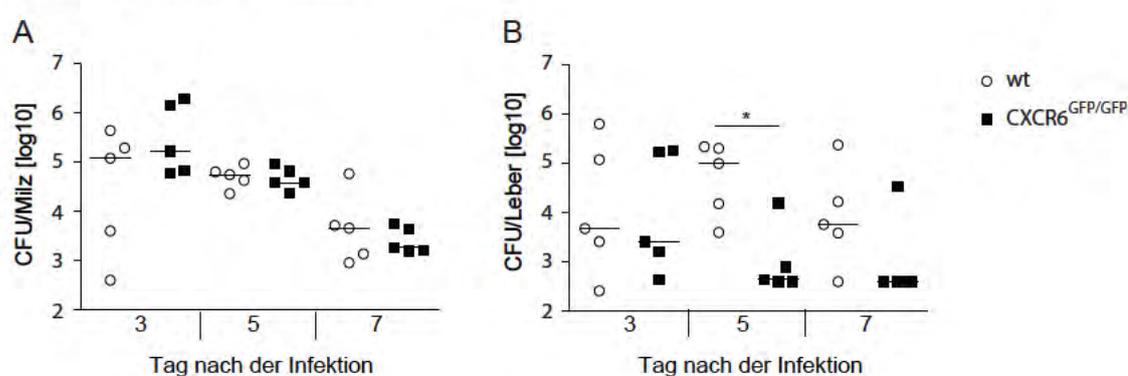


Abbildung 5.4: Listerienbelastung in Milz und Leber von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} Mäusen. Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} C57BL/6 Mäuse wurden mit 1×10^4 *Lm*EGD iv infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Bakterienlast in Milz und Leber mittels serieller Titration bestimmt. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Der Graph gibt Werte für individuell analysierte Tiere und den Median wieder. Die Nachweisgrenze betrug 20 Bakterien pro Organ. CFU, colony forming units; wt, Wildtyp; * $p < 0,05$.

In Abbildung 5.4 sind die Listerienbelastungen (CFU, colony forming units) in Milz und Leber zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. In der Milz nahm die Listerienbelastung im Verlauf der Infektion kontinuierlich ab. Drei Tage nach der Infektion wurden im Mittel 1×10^5 Bakterien nachgewiesen. An Tag 5 waren es noch ca. 5×10^4 Listerien und sieben Tage nach Infektion nur noch 1×10^4 Bakterien. In der Milz gab es für die Kontrolle von Listerien keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und CXCR6-defizienten Mäusen (Abb. 5.4 A). In der Leber von Wildtyp-Mäusen kam es bis Tag 5 nach Infektion zu einem Anstieg der Listerienbelastung, bevor die Anzahl der Bakterien wieder sank. In den CXCR6-defizienten Lebern erfolgte die Kontrolle der Listerien signifikant schneller als in den Wildtyp-Kontrollen. Drei Tage nach Infektion wurden in Wildtyp- und CXCR6-defizienten Lebern ca. 5×10^3 Listerien nachgewiesen. Bis Tag 5 nach Infektion stieg dieser Wert in den Wildtyp-Kontrollen auf ca. 1×10^5 an, während in den Lebern von CXCR6-defizienten Mäusen nur noch weniger als 1×10^3 Bakterien nachgewiesen wurden. Bis sieben Tage nach der Infektion nahm die Belastung in den Wildtyp-Tieren auf ca. 1×10^4 Lis-

terien ab. Die Anzahl der Bakterien in den Lebern der CXCR6-defizienten Mäuse senkte sich bis Tag 7 nach Infektion nicht weiter ab (Abb. 5.4 B).

Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass die Kontrolle einer Listerieninfektion in der Milz unabhängig von dem Chemokinrezeptor CXCR6 verläuft. In der Leber wurde jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und CXCR6-defizienten Mäusen ermittelt. Wie schon in Abschnitt 5.1.3 angedeutet, weisen auch diese Ergebnisse auf eine größere Relevanz des Chemopkinrezeptors CXCR6 in der Leber hin.

5.3 T-Zellantworten von CXCR6^{GFP/GFP} Mäusen

Für die weitere Untersuchung der Relevanz von CXCR6 während einer Listerieninfektion wurde die T-Zellantwort analysiert. Hierzu wurden CXCR6-defiziente (CXCR6^{GFP/GFP}) und Kontrollmäuse (CXCR6^{+/GFP}) mit 1×10^4 *LmOVA* iv infiziert. Listerien infizieren in der Maus bevorzugt Milz und Leber. An Tag 8 bis Tag 10 nach Infektion hat die T-Zellantwort normalerweise ihr Maximum erreicht [2, 5]. Listerien induzieren eine klassische T_H-1 Antwort, bei der die CD4⁺ T-Zellen IFN- γ und TNF- α synthetisieren. Durch eine Listerieninfektion aktivierte CD8⁺ T-Zellen produzieren ebenfalls IFN- γ und TNF- α [79]. Obwohl die initiale Kontrolle von Listerien durch das angeborene Immunsystem erfolgt sind CD8⁺ T-Zellen für die abschließende Eliminierung der Listerien essentiell [2, 5]. An Tag 8 nach Infektion wurden Milz und Leber entnommen, Lymphozyten gereinigt und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht. Wie bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben konnte bisher kein Listerien-spezifisches immundominantes Peptid für CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Deshalb wurden die Tiere mit dem Ovalbumin sekretierenden Listerienstamm *LmOVA* infiziert. Für CD4⁺ T-Zellen ist in C57BL/6 Mäusen das Protein Listeriolysin O (LLO) immundominant. Nach *in vitro* Stimulation der isolierten Lymphozyten mit den Peptiden LLO₁₈₉₋₂₀₁ und OVA₂₅₇₋₂₆₄ (siehe Kap. 4.6.1) können anhand der IFN- γ Produktion Listerien-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Die Anzahl IFN- γ produzierender T-Zellen wurde als Maß für die Anzahl Listerien-spezifischer T-Zellen genutzt. Für die spezifischen T-Zellen wurde das Zytokinprofil bestimmt, wodurch Unterschiede in der Differenzierung der T-Zellen zwischen CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen aufgedeckt werden können. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden auf ihre Expression von IFN- γ untersucht. Zur Analyse der sekundären T-Zellantwort wurden die Tiere vierzig Tage bzw. neun Monate nach der ersten Infektion mit 5×10^5 *LmOVA* iv reinfiziert.

5.3.1 Vergleich der primären T-Zellantworten

Abbildung 5.5 zeigt die primäre CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort von infizierten CXCR6-defizienten (CXCR6^{GFP/GFP}) und Kontroll-Mäusen (CXCR6^{+/GFP}) nach iv Infektion ohne und nach *in vitro* Stimulation mit den Peptiden LLO₁₈₉₋₂₀₁ und OVA₂₅₇₋₂₆₄ in der Milz. In Abbildung 5.5 A und D ist beispielhaft die Expression von IFN- γ auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Oh-

ne Stimulation produzierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen von CXCR6-defizienten und Kontrollmäusen nur sehr wenig $IFN-\gamma$. Nach *in vitro* Stimulation der isolierten T-Zellen mit $LLO_{189-201}$ und $OVA_{257-264}$ konnte eine T-Zellantwort gezeigt werden.

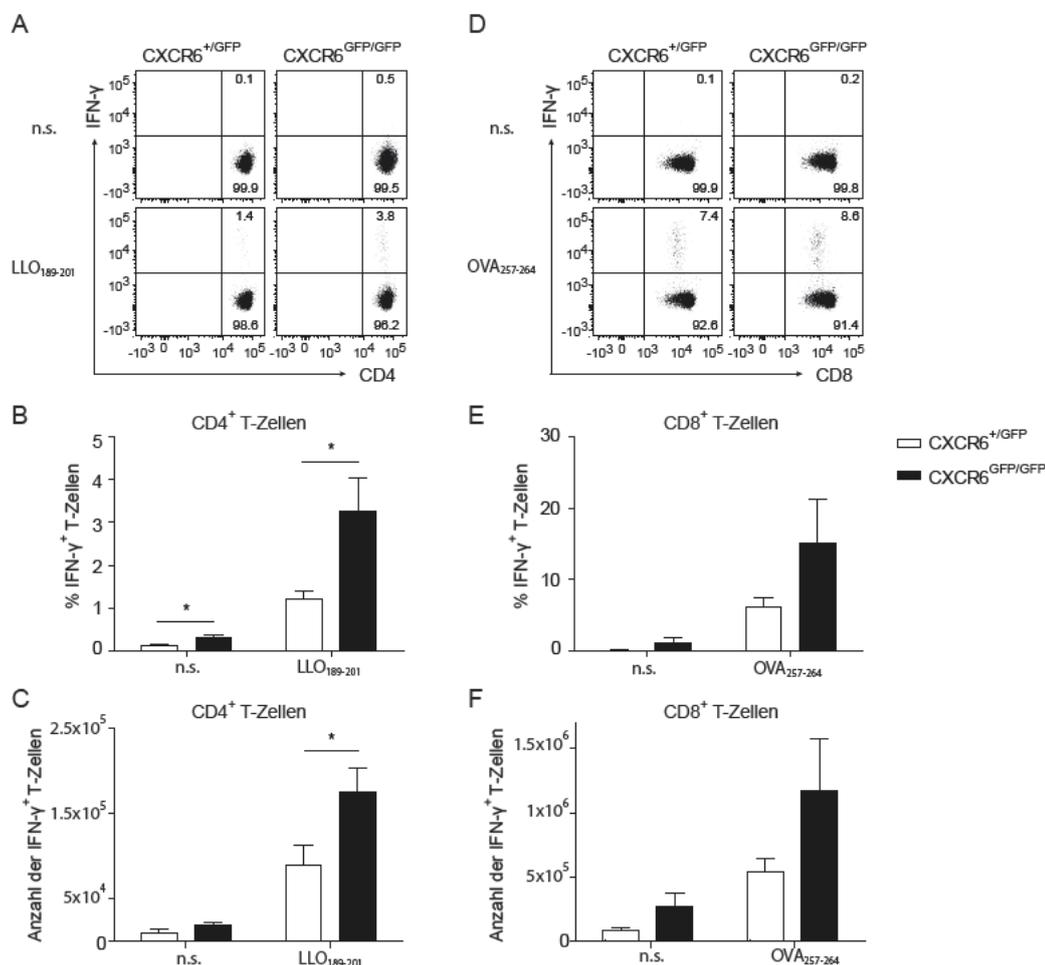


Abbildung 5.5: Primäre T-Zellantwort in der Milz. Kontroll- (CXCR6^{+/GFP}) und CXCR6-defiziente (CXCR6^{GFP/GFP}) Mäuse wurden mit 1×10^4 *LmOVA* iv infiziert. Acht Tage nach der Infektion wurden die Milzen entnommen, Lymphozyten gereinigt und $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen für vier Stunden mit $LLO_{189-201}$ bzw. $OVA_{257-264}$ restimuliert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei Experimenten dargestellt. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$) dar. (A) Beispielhafte Darstellung der Expression von $IFN-\gamma$ auf $CD4^+$ T-Zellen in *Dot-Plots*. (B) Prozentualer Anteil an $CD4^+$ T-Zellen, die $IFN-\gamma$ produzierten. (C) Anzahl an $IFN-\gamma$ -synthetisierenden $CD4^+$ T-Zellen. (D) Beispielhafte Darstellung der Expression von $IFN-\gamma$ auf $CD8^+$ T-Zellen in *Dot-Plots*. (E) Prozentualer Anteil an $CD8^+$ T-Zellen, die $IFN-\gamma$ produzierten. (F) Anzahl an $IFN-\gamma$ -synthetisierenden $CD8^+$ T-Zellen. n.s., nicht stimuliert; * $p < 0,05$.

Der Anteil an $CD4^+$ T-Zellen, die $IFN-\gamma$ produzierten und somit Listerien-spezifisch waren, stieg in den Milzen von Kontrollmäusen nach Stimulation mit $LLO_{189-201}$ von ca. 0,1 % auf etwa 1,5 % an (Abb. 5.5 B, weiße Balken). In den CXCR6-defizienten Mäusen produzierten nach Stimulation mit $LLO_{189-201}$ 3,5 % der $CD4^+$ T-Zellen das Zytokin verglichen mit 0,3 %

der nicht stimulierten CD4⁺ T-Zellen (Abb. 5.5 B, schwarze Balken). Der Unterschied zwischen den CXCR6-defizienten und den Kontroll-Mäusen war sowohl ohne als auch mit LLO₁₈₉₋₂₀₁-Stimulation signifikant (Abb. 5.5 B). Die Anzahl der IFN- γ -produzierenden Listerien-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Milz war nach Stimulation ebenfalls zwischen CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen signifikant unterschiedlich (Abb. 5.5 C). Nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit dem immundominanten Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ konnte verglichen mit dem Ansatz ohne stimulierende Substanzen sowohl für die CXCR6-defizienten als auch für die Kontroll-Mäuse ebenfalls eine Zunahme der IFN- γ -Produktion beobachtet werden (Abb. 5.5 E). Während in den Kontroll-Mäusen nur ca. 7 % der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ IFN- γ produzierten, waren es in den CXCR6-defizienten Milzen ca. 15 % (Abb. 5.5 E). Dieser Unterschied war nicht signifikant, spiegelte sich jedoch auch in den absoluten Zellzahlen wieder. Während in den Kontroll-Mäusen nur 5×10^5 Listerien-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen wurden waren es in den Milzen von CXCR6-defizienten Mäusen mehr als 1×10^6 CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.5 F).

In Abbildung 5.6 ist die primäre CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort in der Leber von CXCR6-defizienten (CXCR6^{GFP/GFP}) und Kontroll-Mäusen (CXCR6^{+/GFP}) nach iv Infektion ohne und nach *in vitro* Stimulation mit den Peptiden LLO₁₈₉₋₂₀₁ und OVA₂₅₇₋₂₆₄ dargestellt. In Abbildung 5.6 A und D ist beispielhaft die Expression von IFN- γ auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Wie in der Milz war auch in der Leber der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die ohne Stimulation das Zytokin IFN- γ produzierten, nur sehr gering (Abb. 5.6 B und E). Nach *in vitro* Stimulation der isolierten T-Zellen mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ und OVA₂₅₇₋₂₆₄ konnte vor allem eine deutliche Population an CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden, die IFN- γ produzierten und somit Listerien-spezifisch waren (Abb. 5.6 E). Der Anteil an Listerien-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten, stieg in den Lebern von Kontroll-Mäusen nach Stimulation mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ auf etwa 1 % an, während in den CXCR6-defizienten Mäusen ca. 1,5 % der CD4⁺ T-Zellen das Zytokin synthetisierten. Der Unterschied zwischen den CXCR6-defizienten und den Kontroll-Mäusen war signifikant (Abb. 5.6 B). In den Lebern von Kontroll-Mäusen wurden nach Stimulation mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ ca. 2×10^3 Listerien-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen. In den Lebern der CXCR6-defizienten Tiere waren es etwa 8×10^3 (Abb. 5.6 C). Dieser Unterschied war jedoch im Gegensatz zu den prozentualen Anteilen nicht signifikant. Nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit dem Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ konnte ebenfalls im Vergleich zu den unstimulierten Ansätzen eine Zunahme der IFN- γ -Produktion beobachtet werden. In beiden Mausstämmen waren nach Stimulation ca. 20 % der CD8⁺ T-Zellen positiv für das Zytokin IFN- γ (Abb. 5.6 E). Die Anzahl der Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen lag in den Lebern von CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen bei mehr als 1×10^5 CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.6 F).

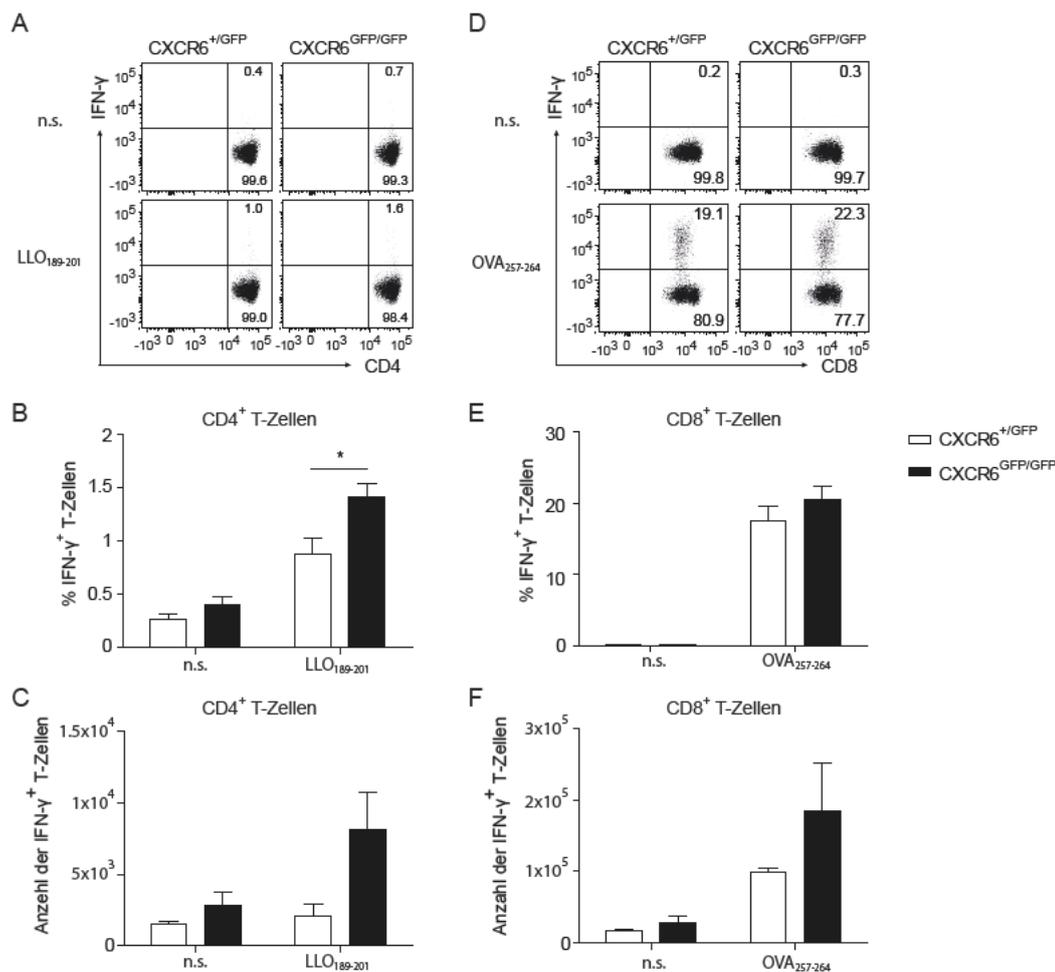


Abbildung 5.6: Primäre T-Zellantwort in der Leber. Kontroll- (CXCR6^{+/GFP}) und CXCR6-defiziente (CXCR6^{GFP/GFP}) Mäuse wurden mit 1×10^4 *LmOVA* iv infiziert. Acht Tage nach der Infektion wurden die Lebern entnommen, Lymphozyten gereinigt und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für vier Stunden mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ bzw. OVA₂₅₇₋₂₆₄ restimuliert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei Experimenten dargestellt. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$) dar. (A) Beispielhafte Darstellung der Expression von IFN- γ auf CD4⁺ T-Zellen in *Dot-Plots*. (B) Prozentualer Anteil an CD4⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten. (C) Anzahl an IFN- γ -synthetisierenden CD4⁺ T-Zellen. (D) Beispielhafte Darstellung der Expression von IFN- γ auf CD8⁺ T-Zellen in *Dot-Plots*. (E) Prozentualer Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten. (F) Anzahl an IFN- γ -synthetisierenden CD8⁺ T-Zellen. n.s., nicht stimuliert; * $p < 0,05$.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sich CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten in Milzen von CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen leicht unterscheiden. Der Anteil und auch die Anzahl der Listerien-spezifischen T-Zellen waren in den Milzen von CXCR6-defizienten Mäusen größer. Für die CD4⁺ T-Zellen, jedoch nicht für die CD8⁺ T-Zellen, konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. In den Lebern von CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen unterschieden sich die T-Zellantworten nicht stark. Obwohl der prozentuale Anteil an Listerien-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in den CXCR6-defizienten Mäusen verglichen mit den Kontroll-Mäusen signifikant erhöht war, konnten für die Unterschiede in der

Anzahl an IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen keine Signifikanz bestimmt werden. Der Anteil und die Anzahl an Listerien-spezifischen und damit IFN- γ -positiven CD8⁺ T-Zellen waren in CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen gleich.

5.3.2 Vergleich der sekundären T-Zellantworten

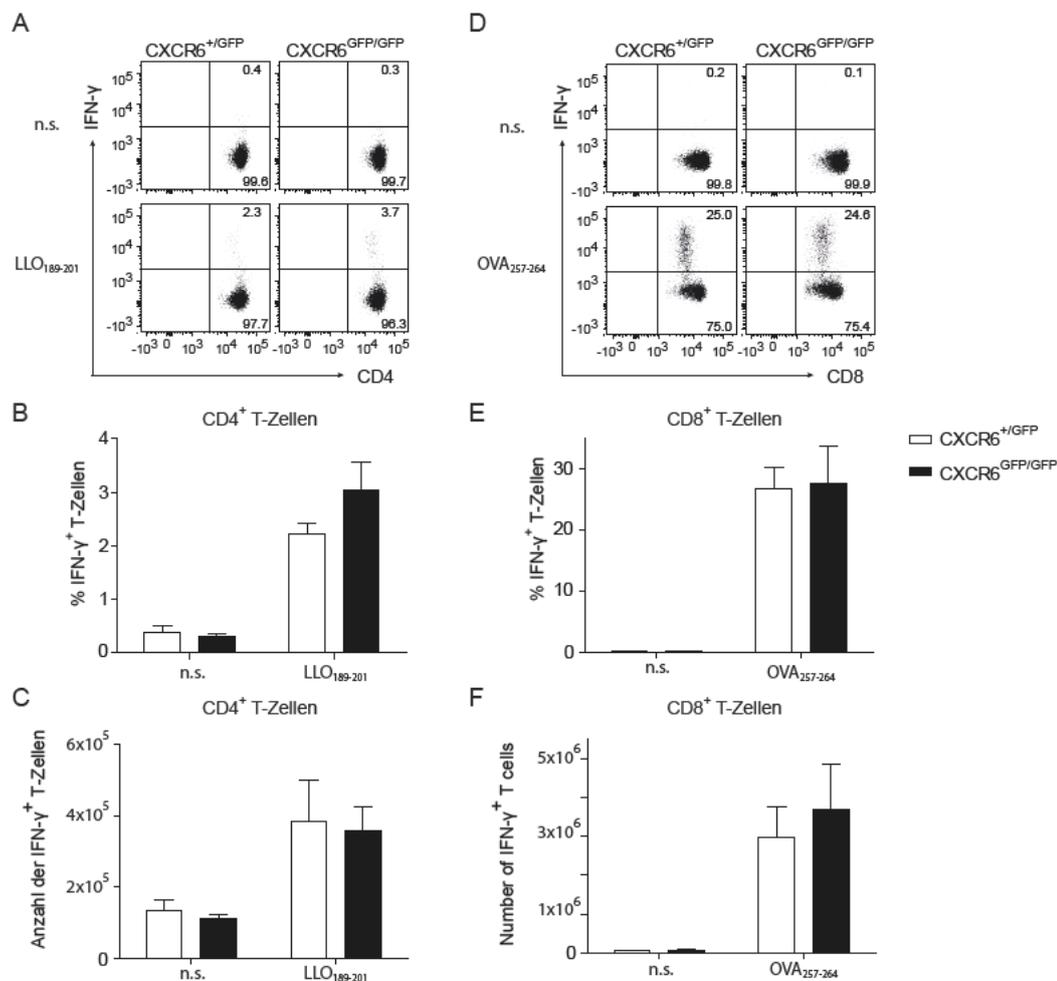


Abbildung 5.7: Sekundäre T-Zellantwort in der Milz. Kontroll- (CXCR6^{+/GFP}) und CXCR6-defiziente (CXCR6^{GFP/GFP}) Mäuse wurden primär mit 1×10^4 *LmOVA* iv und sekundär vierzig Tage später mit 5×10^5 *LmOVA* iv infiziert. Fünf Tage nach der sekundären Infektion wurden die Milzen entnommen, Lymphozyten gereinigt und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für vier Stunden mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ bzw. OVA₂₅₇₋₂₆₄ restimuliert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei Experimenten dargestellt. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$) dar. (A) Beispielhafte Darstellung der Expression von IFN- γ auf CD4⁺ T-Zellen in *Dot-Plots*. (B) Prozentualer Anteil an CD4⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten. (C) Anzahl an IFN- γ -synthetisierenden CD4⁺ T-Zellen. (D) Beispielhafte Darstellung der Expression von IFN- γ auf CD8⁺ T-Zellen in *Dot-Plots*. (E) Prozentualer Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten. (F) Anzahl an IFN- γ -synthetisierenden CD8⁺ T-Zellen. n.s., nicht stimuliert.

In Abbildung 5.7 ist die sekundäre CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort von CXCR6-defizienten (CXCR6^{GFP/GFP}) und Kontroll-Mäusen (CXCR6^{+ /GFP}) in der Milz dargestellt. Die sekundäre Infektion erfolgte vierzig Tage nach der primären Infektion. Abbildung 5.7 A und D zeigt beispielhaft die Expression von IFN- γ auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Ohne Stimulation produzierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen nur sehr wenig IFN- γ . In den Milzen der Kontroll-Mäuse produzierten nach *in vitro* Stimulation mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ ca. 2,5 % der CD4⁺ T-Zellen IFN- γ . In den CXCR6-defizienten waren es ca. 3,5 %. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Abb. 5.7 B). Die Anzahl der IFN- γ -produzierenden und somit Listerien-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Milz lag in beiden Mausstämmen nach Stimulation mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ bei ca. 4×10^5 (Abb. 5.7 C). Nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit dem immun-dominanten Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ konnte eine starke Zunahme der IFN- γ -Produktion beobachtet werden. Mehr als 25 % der CXCR6-defizienten und Kontroll-CD8⁺ T-Zellen synthetisierten das Zytokin IFN- γ und waren spezifisch für die Listerieninfektion (Abb. 5.7 E). Die absolute Anzahl an IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen stieg auf mehr als 3×10^6 an (Abb. 5.7 F). Es gab keine Unterschiede zwischen den CXCR6-defizienten und den Kontroll-Mäusen.

Abbildung 5.8 zeigt die sekundäre CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort von CXCR6-defizienten (CXCR6^{GFP/GFP}) und Kontroll-Mäusen (CXCR6^{+ /GFP}) in der Leber. In Abbildung 5.8 A und D ist beispielhaft die Expression von IFN- γ auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Wie in der Milz und nach primärer Infektion war auch in der Leber nach sekundärer Infektion der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die ohne Stimulation das Zytokin IFN- γ produzierten, nur sehr gering (Abb. 5.8 B und E). Nach *in vitro* Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit dem immundo-minaten Peptid LLO₁₈₉₋₂₀₁ produzierten in CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen im Mittel 4 % das Zytokin IFN- γ (Abb. 5.8 B). Die Anzahl an Listerien-spezifischen CD4⁺ T-Zellen lag nach Stimulation mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ in beiden Mausstämmen bei etwa 1×10^5 (Abb. 5.8 C). Es gab keine signifikanten Unterschiede. CD8⁺ T-Zellen wurden *in vitro* mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ stimuliert. Daraufhin synthetisierten ca. 25 % der CD8⁺ T-Zellen sowohl in den CXCR6-defizienten als auch in den Kontroll-Mäusen IFN- γ (Abb. 5.8 E). Dieser Wert entspricht einer Anzahl von mehr als 1×10^5 CD8⁺ T-Zellen, die das Zytokin IFN- γ produzierten und somit Listerien-spezifisch waren (Abb. 5.8 F). Wie bei den CD4⁺ T-Zellen, gab es auch bei den CD8⁺ T-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen.

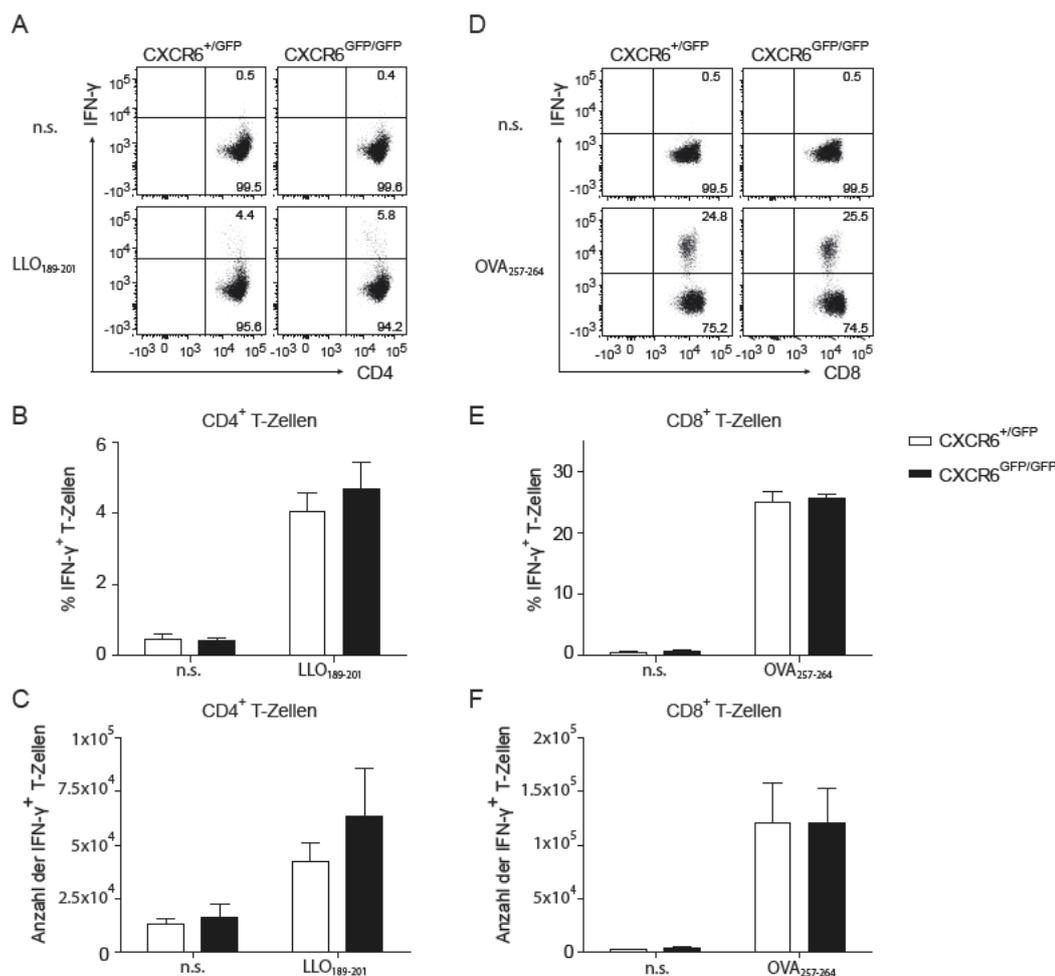


Abbildung 5.8: Sekundäre T-Zellantwort in der Leber. Kontroll- (CXCR6^{+/GFP}) und CXCR6-defiziente (CXCR6^{GFP/GFP}) Mäuse wurden primär mit 1×10^4 *LmOVA* iv und sekundär vierzig Tage später mit 5×10^5 *LmOVA* iv infiziert. Fünf Tage nach der sekundären Infektion wurden die Lebern entnommen, Lymphozyten gereinigt und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für vier Stunden mit LLO₁₈₉₋₂₀₁ bzw. OVA₂₅₇₋₂₆₄ restimuliert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei Experimenten dargestellt. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$) dar. (A) Beispielhafte Darstellung der Expression von IFN- γ auf CD4⁺ T-Zellen in *Dot-Plots*. (B) Prozentualer Anteil an CD4⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten. (C) Anzahl an IFN- γ -synthetisierenden CD4⁺ T-Zellen. (D) Beispielhafte Darstellung der Expression von IFN- γ auf CD8⁺ T-Zellen in *Dot-Plots*. (E) Prozentualer Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten. (F) Anzahl an IFN- γ -synthetisierenden CD8⁺ T-Zellen. n.s., nicht stimuliert.

Die Abbildungen 5.7 und 5.8 zeigen die sekundären T-Zellantworten für eine sekundäre Infektion, die vierzig Tage nach der primären Infektion erfolgte. Um eventuelle spätere Unterschiede zwischen CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen zu zeigen wurde die sekundäre T-Zellantwort auch nach längerer Zeit untersucht. Hierzu wurden die Tiere erst neun Monate nach der primären Infektion reinfiziert. Die Untersuchung dieser sehr späten sekundären T-Zellantwort ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte also in der sekundären CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort von CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen kein Unterschied festgestellt werden. Sowohl der prozentuale Anteil, als auch die absolute Anzahl an Listerien-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen waren in Milzen und Lebern von CXCR6-defizienten und Kontroll-Mäusen ähnlich. Vergleicht man jedoch die primäre T-Zellantwort mit der sekundären T-Zellantwort wird deutlich, dass die sekundäre T-Zellantwort viel stärker ausfiel. Vor allem der Anteil und die absolute Anzahl an CD8⁺ T-Zellen, die Listerien-spezifisch waren und somit IFN- γ produzierten, waren nach einer zweiten Infektion mit Listerien und *in vitro* Stimulation mit dem immundominanten Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ viel größer. Diese starke CD8⁺ T-Zellantwort nach sekundärer Infektion spiegelt die zentrale Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen bei einer Listerieninfektion wieder.

5.4 Migration und Verteilung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

Um die Funktion von CXCR6 für CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen wurden im nächsten Teil dieser Arbeit kompetitive T-Zelltransferexperimente durchgeführt. T-Zelltransfermodelle bieten den Vorteil, dass Gen-defiziente CD8⁺ T-Zellen in einer gesunden Wildtypumgebung mit Wildtyp CD8⁺ T-Zellen verglichen werden können. Durch diesen Ansatz kann die Analyse auf die Funktion eines Gens (hier CXCR6) in CD8⁺ T-Zellen begrenzt werden. In einem kompetitiven Ansatz werden sowohl Wildtyp als auch Gen-defiziente CD8⁺ T-Zellen in die gleiche Empfängermaus übertragen. Das bedeutet, beide T-Zellpopulationen haben ein identisches Umfeld, was insbesondere von Bedeutung ist wenn der Gendefekt einen Einfluß auf den Infektionsverlauf hat. Schließlich ist der kompetitive T-Zelltransfer relativ sensitiv und ermöglicht auch den Nachweis von geringen Unterschieden in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Wildtyp und Gen-defizienten CD8⁺ T-Zellen. In dieser Arbeit wurde ein kompetitiver Transfer von OT-I CD8⁺ T-Zellen verwendet (siehe Kap. 4.2). Diese Zellen erkennen Ovalbumin aus *LmOVA* und sollten daher nach Infektion der Empfängermaus mit diesem Listerienstamm aktiviert werden. Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen wurden mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) (siehe Kap. 4.5) isoliert, zu gleichen Anteilen gemischt und insgesamt 5×10^4 Zellen in die Empfängermaus transferiert. Die Unterscheidung der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen untereinander und von den endogenen CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit Hilfe des Zelloberflächenmoleküls CD90 (siehe Kap. 4.2). Die Empfängermaus wurden vier Stunden vor dem Transfer der OT-I CD8⁺ T-Zellen mit 1×10^5 *LmOVA* intraperitoneal (ip) infiziert. Drei und fünf Tage nach dem kompetitiven Transfer der Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in die infizierten Empfängermaus wurden Milzen und Lebern entnommen und Lymphozyten aus diesen Organen isoliert.

5.4.1 Vergleich der Migration und Verteilung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

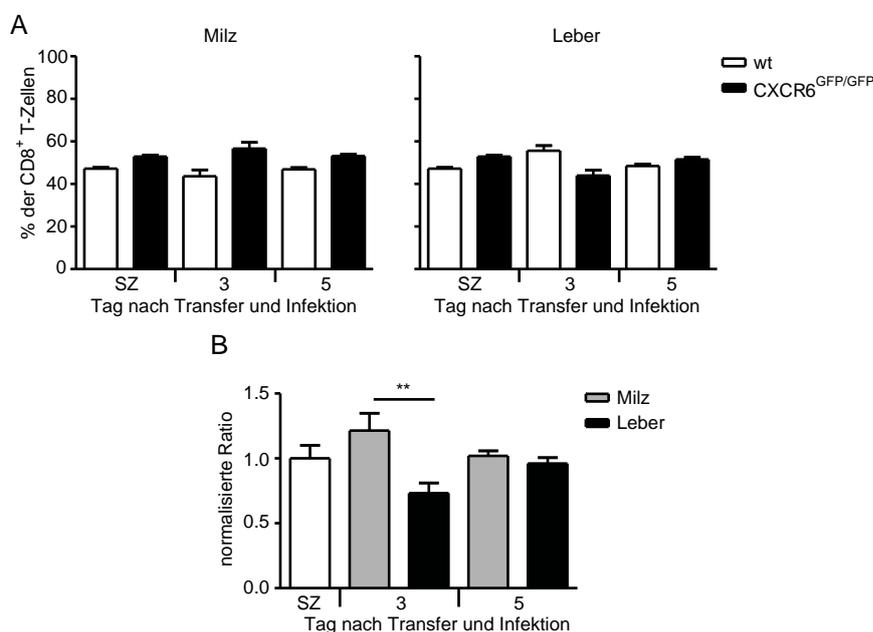


Abbildung 5.9: Verteilung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in Wildtyp Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte CD90.1 kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. Drei und fünf Tage *p.i.* wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n=7$) dar. (A) Prozentualer Anteil der transferierten Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen in den angegebenen Organen. (B) Normalisierte Ratio der transferierten Zellen in den angegebenen Organen. Die normalisierte Ratio ist die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen, die auf das Verhältnis der Verteilung der transferierten Zellen normalisiert wurde. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen; ** $p < 0,01$.

In Abbildung 5.9 ist die Verteilung der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber der Wildtyp Empfängermäuse dargestellt. Um Unterschiede in der Verteilung besser sichtbar zu machen wurde die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen berechnet und auf das Verhältnis der Verteilung der transferierten Zellen normalisiert. In der Milz war der Anteil an CXCR6-defizienten Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen an Tag 3 nach dem Transfer etwas größer (Abb. 5.9 A). Die normalisierte Ratio erreichte einen Wert von ca. 1,2 (Abb. 5.9 B). Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt mehr CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen als Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten. In der Leber hingegen war der Anteil an CXCR6-defizienten Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen etwas kleiner (Abb. 5.9 A). Die normalisierte Ratio hatte einen Wert von ungefähr 0,7 (Abb. 5.9 B). Der Unterschied der normalisierten Ratio zwischen Milz und Leber war signifikant (Abb. 5.9 B). Fünf Tage nach dem Transfer verteilten sich die Wildtyp und CXCR6-defizienten Zellen in Milz und Leber ähnlich (Abb. 5.9 A), die normalisierte Ratio hatte

jeweils einen Wert von etwa 1 (Abb. 5.9 B). Ohne *LmOVA*-Infektion konnten weder an Tag 3 noch an Tag 5 nach Transfer OT-I CD8⁺ T-Zellen in den Empfängertieren wiedergefunden werden, was aufgrund der niedrigen Zahl an transferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen zu erwarten war (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen drei Tage nach dem Transfer bevorzugt in der Milz anreichern und nur in geringem Umfang in die Leber einwandern. An Tag 5 hatte sich diese Verteilung aber wieder an die Verteilung von Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen angeglichen. CXCR6 scheint daher vor allem in der frühen Phase der T-Zellantwort eine Rolle zu spielen. In der späteren Phase der Antwort kann das Fehlen von CXCR6 scheinbar durch andere Mechanismen kompensiert werden.

5.4.2 Vergleich der Aktivierung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

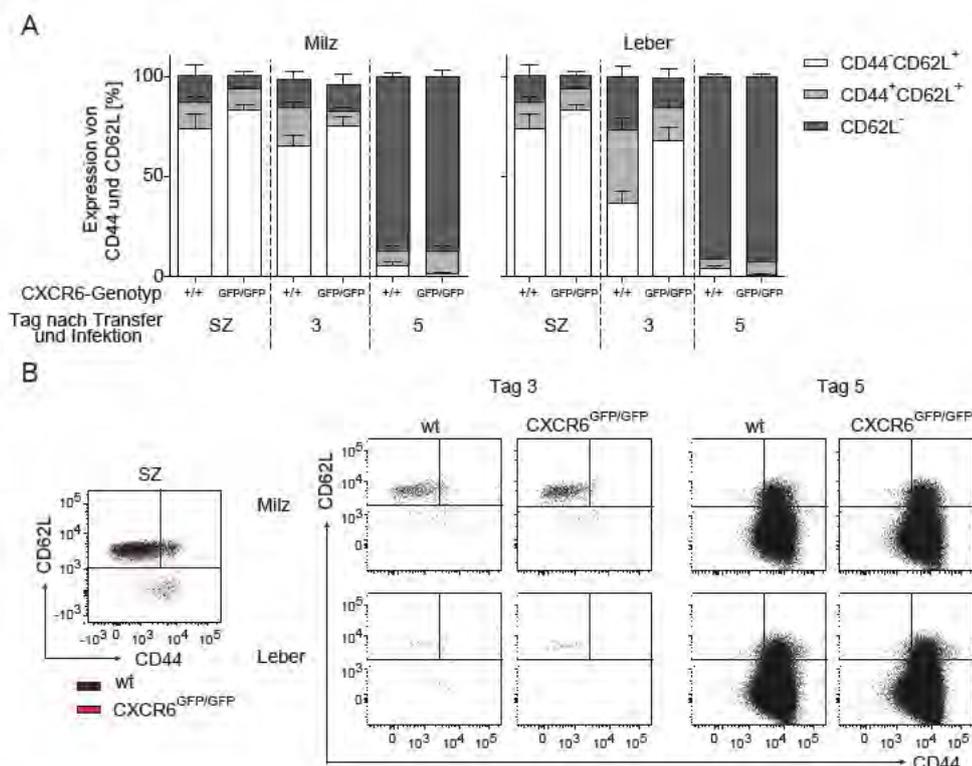


Abbildung 5.10: Aktivierungsstatus von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in Wildtyp Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte transgene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. Drei und fünf Tage *p.i.* wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n=7$) dar. (A) Verteilung der CD44⁻CD62L⁺, CD44⁺CD62L⁺ und CD62L⁻ Zellen innerhalb der Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen. (B) Beispielhafte Darstellung der Expression von CD44 und CD62L auf den transferierten Zellen im *Dot-Plot*. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen.

Um die transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen weiter zu charakterisieren wurde der Aktivierungsstatus dieser Zellen in Milz und Leber analysiert (Abbildung 5.10). Für die Untersuchung des Aktivierungsstatus der Zellen wurde die Expression von CD44 und CD62L auf den T-Zellen analysiert. Naive CD8⁺ T-Zellen sind CD44⁻CD62L⁺. Zentrale Gedächtniszellen exprimieren sowohl CD44 als auch CD62L, während Effektorzellen nur CD44-positiv sind und kein CD62L exprimieren [8, 9]. Vor dem Transfer, also die Spenderzellen, hatten Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen ein vergleichbares Expressionsprofil für CD44 und CD62L. Ungefähr 80 % der Zellen hatten einen naiven CD44⁻CD62L⁺ Phänotyp. Die restlichen Zellen teilten sich gleichmäßig in voraktivierte T-Zellen (CD44⁺CD62L⁺), inklusive zentraler Gedächtniszellen und Effektorzellen (CD62L⁻) auf. Drei Tage nach dem kompetitiven Transfer war der Aktivierungsstatus der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber unterschiedlich. Die Wildtyp Zellen waren phänotypisch signifikant stärker aktiviert. Während in der Milz 20 % der transferierten Wildtyp Zellen CD44⁺ waren hatten nur ca. 10 % der transferierten CXCR6-defizienten Zellen diesen Phänotyp. Verglichen mit den Wildtyp Zellen blieben andererseits mehr CXCR6-defiziente Zellen naiv und exprimierten noch kein CD44. In der Leber war der Unterschied zwischen den transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen drei Tage nach dem Transfer und der Infektion der Empfängermäuse deutlich größer als in der Milz. Während mehr als 60 % der CXCR6-defizienten Zellen noch den naiven Phänotyp aufwiesen und kein CD44 exprimierten, waren es unter den Wildtyp Zellen nur noch weniger als 40 %. Der Anteil an CD44⁺CD62L⁺ Zellen von den CXCR6-defizienten Zellen war mit 20 % verglichen mit fast 40 % von den Wildtyp Zellen nur ungefähr halb so groß. Die Population an Effektorzellen war innerhalb der transferierten Wildtyp Zellen auch etwas größer als in den CXCR6-defizienten Zellen, unterschied sich aber nicht signifikant. Fünf Tage nach dem Transfer hatten ca. 90 % der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen sowohl in der Milz als auch in der Leber den aktivierten CD62L⁻ Phänotyp. Zu diesem Zeitpunkt gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden transferierten Zelltypen (Abb. 5.10 A). In Abbildung 5.10 B ist beispielhaft die Expression von CD44 und CD62L auf den transferierten Zellen dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des Aktivierungsstatus von T-Zellen ist die Analyse der Expression von KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*). Terminale Effektorzellen sind KLRG1⁺, während dieses Molekül auf naiven und früh aktivierten CD8⁺ T-Zellen nicht zu finden ist [8, 12, 14]. In Abbildung 5.11 ist die mittlere Fluoreszenzintensität der KLRG1-Expression der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber der infizierten Empfängermäuse dargestellt. Vor dem Transfer war die mittlere Fluoreszenzintensität der KLRG1-Expression der beiden Spenderzellpopulationen nahezu gleich. Drei Tage nach dem Transfer war die KLRG1-Expression auf den Wildtyp Zellen verglichen mit den CXCR6-defizienten Zellen in der Leber signifikant größer. In der Milz gab es zu diesem Zeitpunkt keinen Unterschied. An Tag 5 nach dem Transfer unterschied sich

das KLRG1-Expressionsprofil beider Zellpopulationen in Milz und Leber nicht voneinander (Abb. 5.11 A). Mit Hilfe der Färbung der KLRG1-Expression auf den transferierten T-Zellen konnte gezeigt werden, dass an Tag 3 die Wildtyp CD8⁺ T-Zellen bereits einen hohen Anteil an hochaktivierten T-Zellen enthielten. Abbildung 5.11 B zeigt beispielhaft die Expression von KLRG-1 auf den transferierten Zellen.

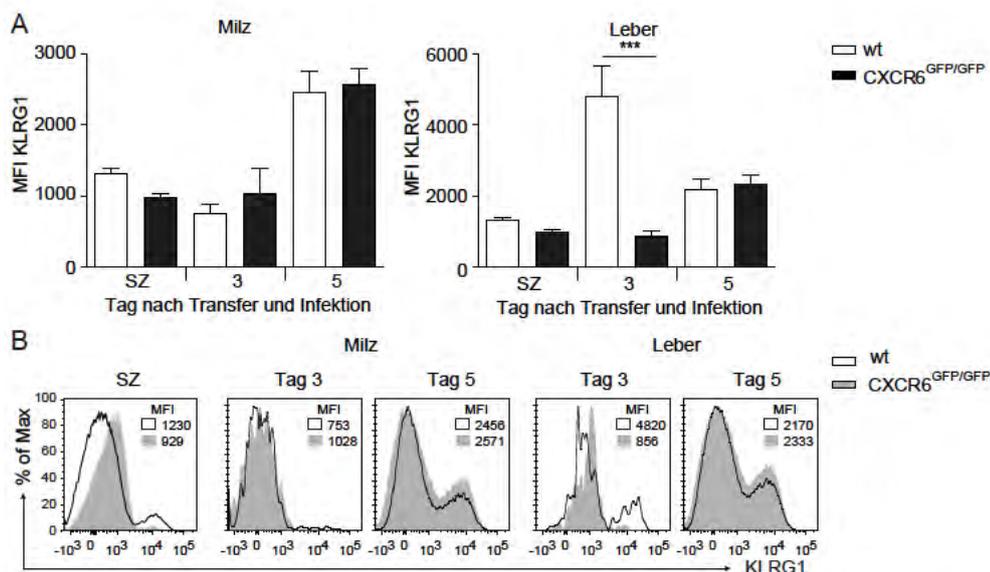


Abbildung 5.11: KLRG1-Expression von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in Wildtyp Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte transgene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. Drei und fünf Tage *p.i.* wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n=7$) dar. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der transferierten Zellen für die Expression von KLRG1. (C) Beispielhafte Darstellung der KLRG1-Färbung der transferierten Zellen in einem Histogramm. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; *** $p < 0,001$.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR6 in der frühen Phase der Listerieninfektion wichtig für die Migration von CD8⁺ T-Zellen ist. Drei Tage nach Infektion der Empfängermäuse und kompetitivem Transfer zeigten die CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen eine bevorzugte Anreicherung in der Milz, während in der Leber mehr OT-I CD8⁺ T-Zellen zu finden waren. Weiterhin waren Wildtyp CD8⁺ T-Zellen in der Leber stärker aktiviert als die CXCR6-defizienten Zellen. Sie wiesen eine verstärkte Expression von CD44 auf und ein größerer Anteil hatte den KLRG1⁺ Phänotyp von terminalen Effektorzellen. An Tag 5 waren diese Unterschiede nicht mehr nachweisbar. Vermutlich kann das Fehlen von CXCR6 zu diesem Zeitpunkt durch andere Mechanismen wieder ausgeglichen werden.

5.5 Überleben von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

Im zweiten Ansatz von T-Zelltransferexperimenten wurden RAG1-defiziente Mäuse als Rezipienten verwendet. Diesen Mäusen fehlen aufgrund des knock-out des *recombination activation gene 1* (RAG1) B- und T-Lymphozyten. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass auch sehr späte Ereignisse nach dem T-Zelltransfer untersucht werden können, da eine Abstoßungsreaktion der transferierten Zellen durch endogene Immunzellen ausgeschlossen werden kann. Fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Wochen nach der Infektion und dem kompetitiven Transfer der Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in die Empfängermäuse wurden Milz, Leber, Lunge, Blut, Lymphknoten und Knochenmark entnommen und Lymphozyten isoliert. In den folgenden Abschnitten werden die transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich verschiedener Funktionen miteinander verglichen.

5.5.1 Vergleich der Verteilung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

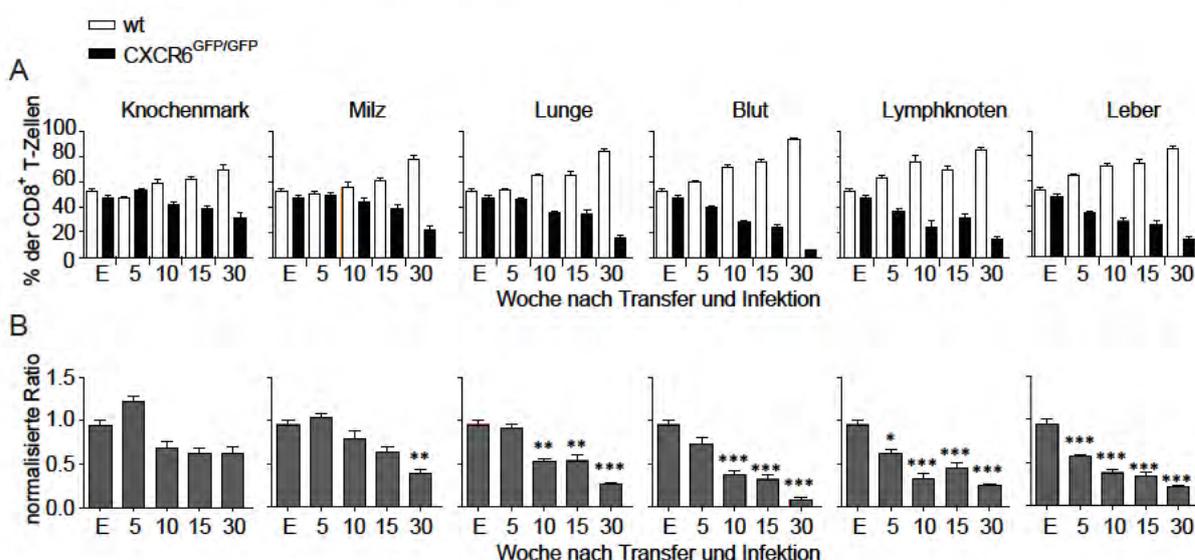


Abbildung 5.12: Verteilung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus Knochenmark, Milz, Lunge, Blut, Lymphknoten und Leber der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 6$) dar. (A) Prozentualer Anteil der transferierten Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen in den angegebenen Organen. (B) Normalisierte Ratio der transferierten Zellen in den angegebenen Organen. Die normalisierte Ratio ist die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen, die auf das Verhältnis der Verteilung der transferierten Zellen normalisiert wurde. wt, Wildtyp; E, Einsatz; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abbildung 5.12 zeigt die Verteilung der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in verschiedenen Organen der RAG1^{-/-} Empfängermause. In allen Organen ist zu erkennen, dass im Verlauf der Zeit der Anteil an transferierten CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen, verglichen mit den transferierten Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen abnimmt (Abb. 5.12 A). Um Unterschiede in der Verteilung besser sichtbar zu machen wurde die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen berechnet und auf das Verhältnis der Verteilung der transferierten Zellen normalisiert (Abb. 5.12 B). Im Knochenmark bleibt die Ausgangsverteilung der beiden CD8⁺ T-Zellpopulationen über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ stabil und die normalisierte Ratio erreicht zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied verglichen mit dem Ausgangswert. In der Milz der Empfängermause war die normalisierte Ratio dreißig Wochen nach dem Transfer verglichen mit dem Ausgangswert signifikant geringer. Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt signifikant weniger CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen verglichen mit den Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten. In Lunge und Blut wurde bereits zehn Wochen nach dem Transfer beobachtet, dass signifikant weniger CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen vorhanden waren. In diesen Organen verringerte sich das Verhältnis im Verlauf der Zeit noch weiter. In den Lymphknoten und in der Leber war bereits fünf Wochen nach dem Transfer eine veränderte normalisierte Ratio zu erkennen. Auch in diesen Organen war der Anteil an transferierten CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen verglichen mit den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen signifikant kleiner und verminderte sich mit der Zeit noch weiter. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im Verlauf des Beobachtungszeitraums der Anteil an transferierten CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen verglichen mit dem Anteil der transferierten Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen in allen untersuchten Organen mit Ausnahme des Knochenmarks deutlich abnahm.

5.5.2 Vergleich der Apoptose von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

Der Nachteil der CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen könnte zwei Ursachen haben. Die Zellen könnten einerseits vermehrt apoptotisch werden, das heißt den programmierten Zelltod durchlaufen, oder ihre Fähigkeit zu proliferieren könnte vermindert sein.

In einer ersten Serie von Experimenten wurde die Apoptose der transferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen untersucht. Als Nachweis der Apoptose diente einerseits die Bindung von Annexin V an die apoptotische Zelle (siehe Kap. 4.9.1) und andererseits der Nachweis von aktivierten Caspasen mit der FLICA (*Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases*) Färbung (siehe Kap. 4.9.2). Zellen transferieren während der Apoptose Phosphatidylserin von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran. Das Protein Annexin V bindet in Abhängigkeit von Calcium an Phosphatidylserin und kann zur Identifizierung von apoptotischen Zellen genutzt werden [76].

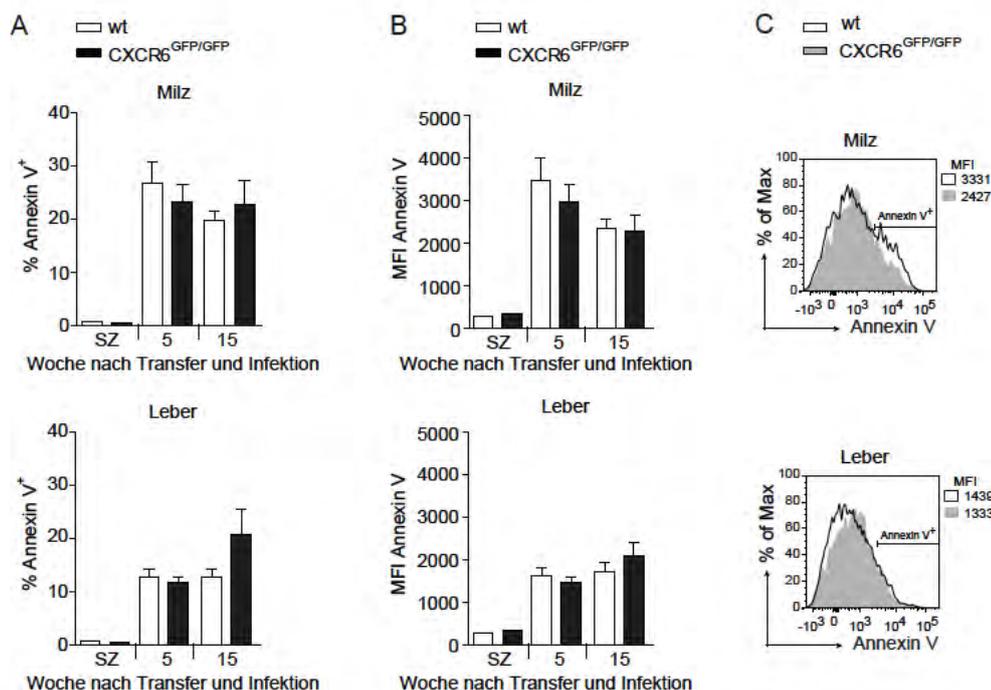


Abbildung 5.13: Annexin V-Bindung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Fünf und fünfzehn Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 6$) oder die mittlere Fluoreszenzintensität der OT-I Zellen dar. (A) Prozentualer Anteil an Annexin V-positiven Zellen der transferierten Zellen. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der transferierten Zellen für die Annexin V-Färbung. (C) Beispielhafte Darstellung der Annexin V-Färbung der transferierten Zellen in einem Histogramm. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

Abbildung 5.13 zeigt die Bindung von Annexin V an Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Vor dem Transfer konnte innerhalb der transferierten Zellen nur ein minimaler Anteil an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5.13 A). Fünf und fünfzehn Wochen nach dem Transfer zeigten in der Milz zwischen 20 und 30 % der transferierten Zellen eine Bindung von Annexin V. In der Leber waren nur zwischen 10 und 20 % der Zellen positiv für Phosphatidylserin. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.13 A). Wie der prozentuale Anteil der transferierten Zellen war auch die mittlere Fluoreszenzintensität der Annexin V Bindung in der Milz größer als in der Leber. Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen den transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen beobachtet (Abb. 5.13 B). In Abbildung 5.13 C ist beispielhaft die Annexin V-Färbung dargestellt. Mit Hilfe der Bindung von Annexin V an apoptotische Zellen konnten daher weder in Milz noch in Leber Unterschiede zwischen den transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

Neben dem Transfer von Phosphatidylserin von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran ist die Aktivierung von Caspasen ein weiteres entscheidendes apoptotisches Ereignis. FLICA sind Fluorochrom-gekoppelte Caspaseinhibitoren in Form von kurzen Peptiden. Sie können die Zellmembran leicht durchdringen und im Zellinneren irreversibel an die katalytischen Zentren von aktivierten Caspasen binden, was zur Anreicherung des Fluorochroms in der Zelle führt [77].

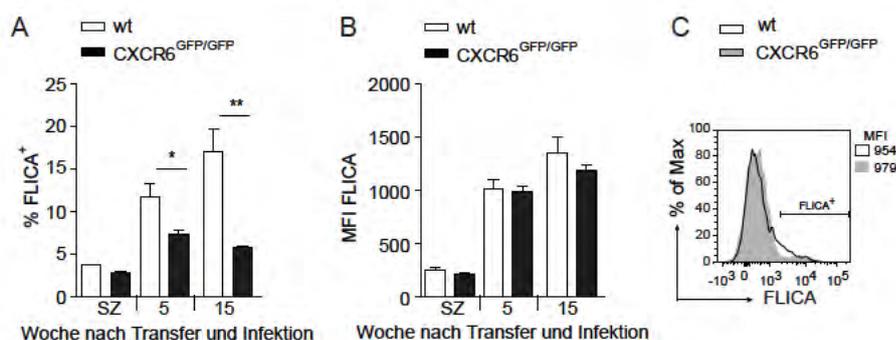


Abbildung 5.14: FLICA-Färbung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Fünf und fünfzehn Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 6$) oder die mittlere Fluoreszenzintensität der OT-I Zellen dar. (A) Prozentualer Anteil an FLICA-positiven Zellen der transferierten Zellen. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der transferierten Zellen für die FLICA-Färbung. (C) Beispielhafte Darstellung der FLICA-Färbung der transferierten Zellen in einem Histogramm. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

In Abbildung 5.14 ist die FLICA-Färbung von Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse in der Milz dargestellt. Von den Ausgangszellen waren weniger als 5 % FLICA-positiv, wobei kein Unterschied zwischen den Wildtypkontrollen und den CXCR6-defizienten Zellen nachgewiesen werden konnte. Fünf und fünfzehn Wochen nach dem Transfer war der Anteil an Wildtyp Zellen, die FLICA-positiv waren, signifikant größer als der Anteil an CXCR6-defizienten Zellen. Während zu beiden Zeitpunkten ungefähr 5 % der CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen FLICA gebunden hatten, waren es fünf Wochen nach dem Transfer mehr als 10 % und fünfzehn Wochen nach dem Transfer mehr als 15 % der Wildtyp Zellen (Abb. 5.14 A). Die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität der FLICA-Bindung ergab zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden transferierten Zellgruppen und konnte eine unterschiedliche Apoptoserate nicht bestätigen (Abb. 5.14 B). Hier ist aber zu beachten, dass bei niedrigen Frequenzen an positiven Zellen, wie hier der FLICA-positiven Zellen, Veränderungen in den Frequenzen sich nur im geringen Umfang auf die MFI auswirken. Abbildung 5.14 C zeigt eine beispielhafte Darstellung der FLICA-Färbung der transferierten Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Apoptoserate der transferierten CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nicht der Grund für den Nachteil dieser Zellen war. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte und mit keiner der beiden angewandten Methoden konnte eine gesteigerte Apoptose der CXCR6-defizienten Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an FLICA-positiven Zellen war sogar bei den Wildtyp Zellen größer als bei den CXCR6-defizienten Zellen. Eine unterschiedliche Apoptoserate kann als Grund für die verschiedene Verteilung und den Nachteil der CXCR6-defizienten Zellen ausgeschlossen werden.

5.5.3 Vergleich der Proliferation von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

Zur weiteren Analyse des Nachteils der CXCR6-defizienten gegenüber den Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse wurde die Proliferation dieser Zellen untersucht. Zum Nachweis der Proliferation diente einerseits die Färbung von Ki-67 und andererseits die Einlagerung von BrdU in neu synthetisierte DNA. Die Expression von Ki-67 ist strikt mit der Zellproliferation assoziiert. Ki-67 ist während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) vorhanden, jedoch in ruhenden Zellen abwesend [73].

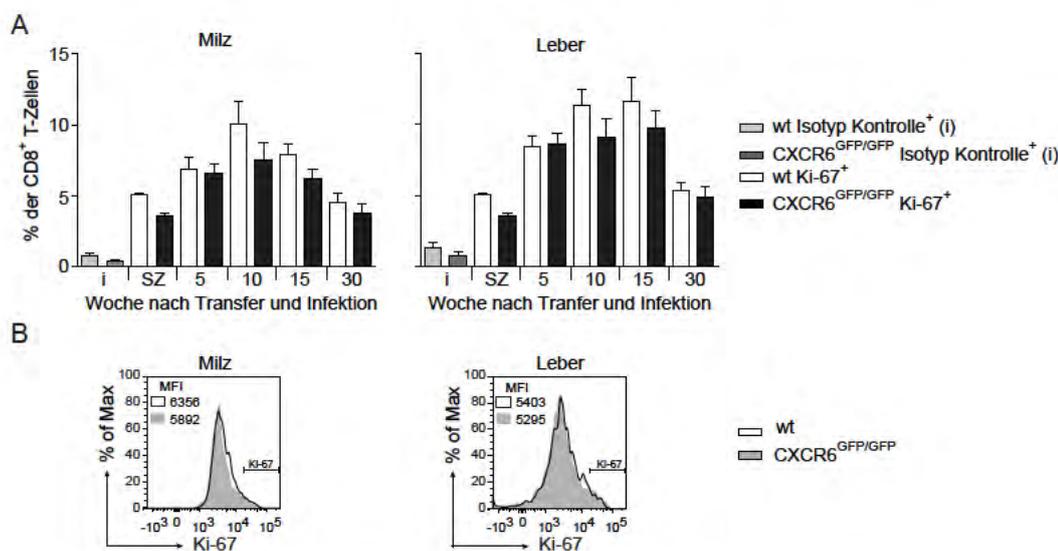


Abbildung 5.15: Ki-67-Expression von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 6$) dar. (A) Prozentualer Anteil an Ki-67-positiven Zellen der transferierten Zellen. (B) Beispielhafte Darstellung der Ki-67-Färbung der transferierten Zellen in einem Histogramm. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

Abbildung 5.15 zeigt die Expression des Proteins Ki-67 in CXCR6-defizienten und Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp Zellen eine stärkere Expression von Ki-67 aufwiesen. Die Unterschiede waren zwar nicht signifikant, wurden jedoch zu jedem der analysierten Zeitpunkte und sowohl in der Milz als auch in der Leber beobachtet (Abb. 5.15 A). Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass es Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen den transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen gibt. In Abbildung 5.15 B ist beispielhaft die KI-67-Färbung auf den transferierten Zellen dargestellt.

Um eine sichere Aussage treffen zu können wurde zusätzlich ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin, BrdU (Bromodeoxyuridine), verwendet. BrdU wird während der S-Phase des Zellzyklus in neu synthetisierte DNA eingelagert. Mit Hilfe von Fluorochrom-markierten spezifischen Anti-BrdU Antikörpern kann der Einbau von BrdU in die DNA und somit die Proliferation von Zellen nachgewiesen werden [74].

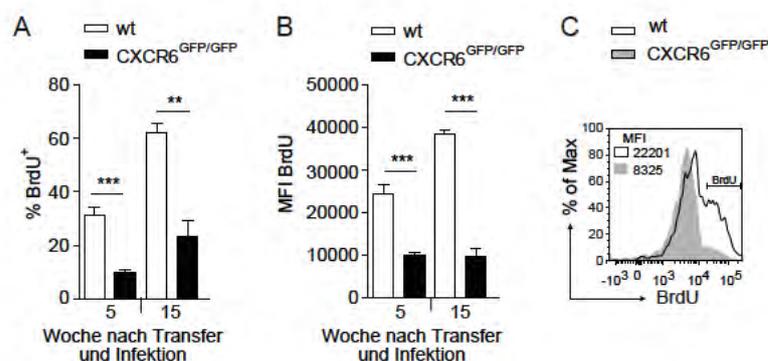


Abbildung 5.16: BrdU-Einlagerung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Jeweils einen Tag vor der Organentnahme wurde den Mäusen 1 mg BrdU injiziert. Fünf und fünfzehn Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 6$) oder die mittlere Fluoreszenzintensität der OT-I Zellen dar. (A) Prozentualer Anteil an BrdU-positiven Zellen der transferierten Zellen. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der transferierten Zellen für die BrdU-Färbung. (C) Beispielhafte Darstellung der BrdU-Färbung der transferierten Zellen in einem Histogramm. wt, Wildtyp; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

In Abbildung 5.16 ist die Einlagerung von BrdU in Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse dargestellt. Einen Tag vor der Organentnahme wurde den Mäusen 1 mg BrdU injiziert. Fünf und fünfzehn Wochen nach dem Transfer war der Anteil an Wildtyp Zellen, die BrdU eingelagert hatten, signifikant größer als bei den CXCR6-defizienten Zellen. Während fünf Wochen nach dem Transfer mehr als 30 % der Wildtyp Zellen BrdU-positiv waren, lagerten nur ca. 10 % der CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen das Thymidin-Analogon ein. Fünfzehn Wochen nach dem Transfer war der Unterschied

ebenfalls signifikant. Mehr als 60 % der Wildtyp Zellen hatten verglichen mit ca. 20 % der CXCR6-defizienten Zellen BrdU in ihre DNA eingelagert (Abb. 5.16 A). Auch die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität der BrdU-Färbung ergab an den untersuchten Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden transferierten Zellgruppen und konnte eine unterschiedliche Proliferationsrate bestätigen (Abb. 5.16 B). Abbildung 5.16 C zeigt eine beispielhafte Darstellung der BrdU-Färbung der transferierten Zellen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die transferierten Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen stärker proliferieren, als die CXCR6-defizienten Zellen. Zu jedem der untersuchten Zeitpunkte und mit beiden verwendeten Methoden konnte eine niedrigere Proliferationsrate der CXCR6-defizienten Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen nachgewiesen werden. Die verminderte Fähigkeit der CXCR6-defizienten Zellen zu proliferieren kann als Grund für die unterschiedliche Verteilung und den Nachteil der CXCR6-defizienten Zellen angenommen werden.

5.5.4 Vergleich der Erschöpfung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

Die verminderte Proliferation der CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse könnte durch das Phänomen der "Exhaustion", also der Ausgezehrt-heit oder Erschöpfung dieser Zellen erklärt werden. Die Identifizierung von *Exhaustion* kann unter anderem über die Expression von verschiedenen Molekülen, wie PD-1, LAG3 und CD244 geschehen. PD-1 ist ein Rezeptor, der der Inhibition von T-Zellantworten dient. LAG3 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wird mit der Regulation des Zellzyklus von T-Zellen assoziiert. CD244 ist ein NK-Zellrezeptor und wird auch auf CD8⁺ T-Effektorzellen exprimiert [18, 19].

Abbildung 5.17 zeigt die Expression der Erschöpfungsmoleküle PD-1, LAG3 und CD244 auf Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Vor dem Transfer exprimierten die Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen die untersuchten Moleküle etwa gleich stark. Nach dem Transfer nahm die Expression aller untersuchten Moleküle bei beiden Zellpopulationen deutlich zu. Die Expression von PD-1 war auf den CXCR6-defizienten Zellen ab zehn Wochen nach dem Transfer etwas stärker als auf den Wildtyp Zellen. LAG3 hingegen wurde an allen untersuchten Zeitpunkten auf den Wildtyp Zellen stärker exprimiert. Die Expression von CD244 war ebenfalls an den meisten Zeitpunkten auf den Wildtyp Zellen stärker als auf den CXCR6-defizienten Zellen (Abb. 5.17 A). In Abbildung 5.17 B ist die Färbung der Erschöpfungsmarker von den transferierten Zellen beispielhaft dargestellt.

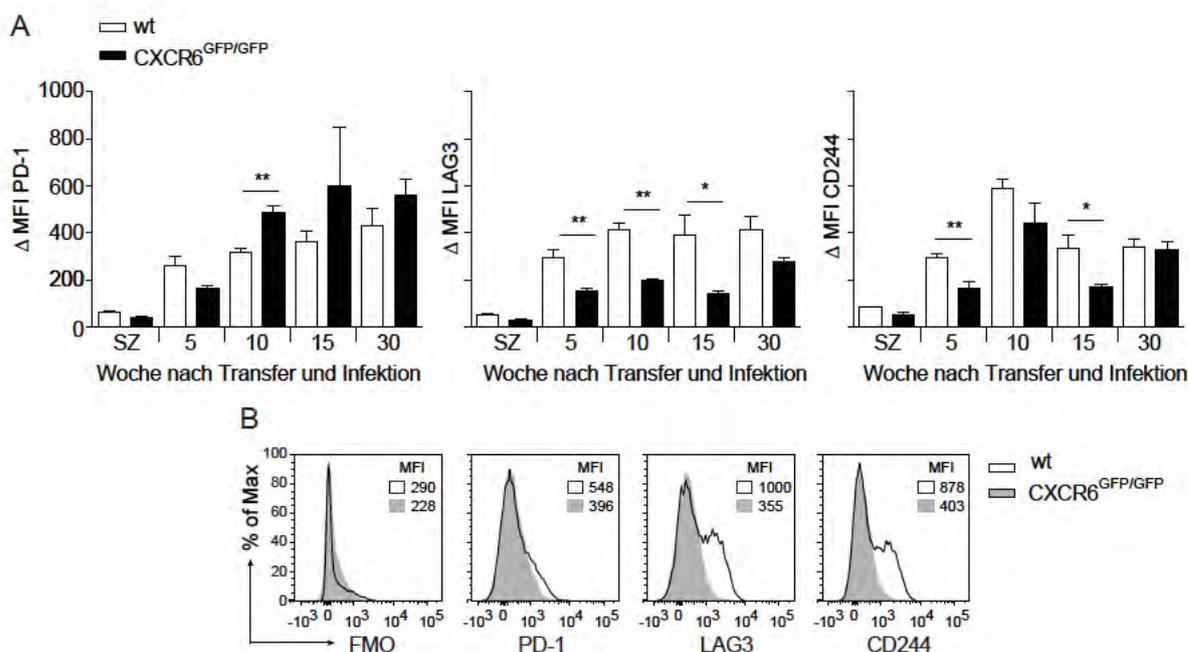


Abbildung 5.17: Erschöpfung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Für jede Probe wurden jeweils auch für die untersuchten Parameter ungefärbte Zellen (FMO, *Fluorescence minus one*) gemessen. Die Balken geben die Differenz zwischen tatsächlicher Färbung und FMO-Färbung (Δ MFI) an ($n \geq 6$). Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. (A) Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität der transferierten Zellen für die Färbung von PD-1, LAG3 und CD244. (B) Beispielhafte Darstellung der Färbung der FMO-Kontrolle und der Erschöpfungsmarker von den transferierten Zellen in einem Histogramm. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse verglichen mit Wildtyp Zellen keinen für die *Exhaustion* typischen Phänotyp aufwiesen. Obwohl die Expression von PD-1 auf CXCR6-defizienten etwas höher war als auf den Wildtyp-Zellen, exprimierten die Wildtyp Zellen mehr LAG3 und CD244. Die *Exhaustion* zeichnet sich aber nicht nur durch die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen, sondern auch durch verstärkte Apoptose sowie eine verminderte Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität aus. Die Untersuchung der Zytokinproduktion der transferierten Zellen gab weiteren Aufschluss über den Erschöpfungszustand der Wildtyp und CXCR6-defizienten Zellen.

5.5.5 Vergleich der Zytokin-Produktion von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

Die Funktionalität von CD8⁺ T-Effektorzellen kann über die Analyse der Zytokinproduktion untersucht werden. Deshalb wurde die Fähigkeit von Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I

CD8⁺ T-Zellen IFN- γ und TNF- α Produktion analysiert.

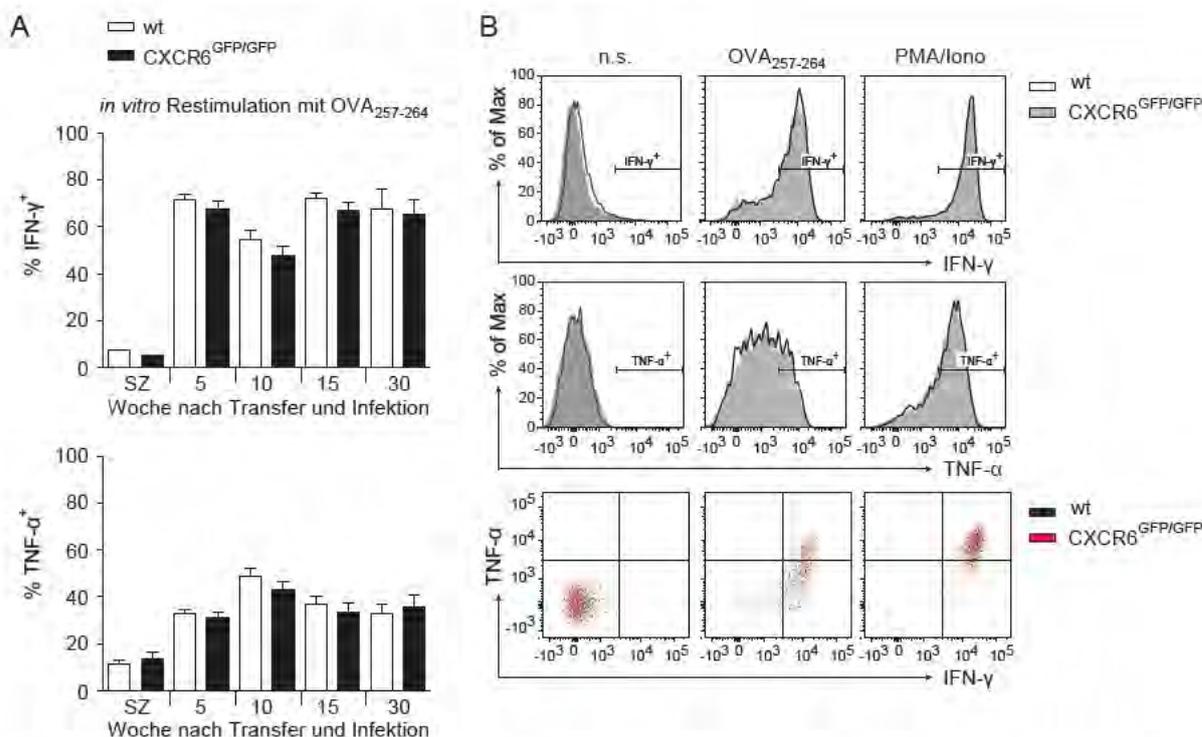


Abbildung 5.18: Zytokin-Produktion von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 6$) dar. (A) Prozentualer Anteil an IFN- γ und TNF- α -positiven Zellen der transferierten Zellen. (B) Beispielhafte Darstellung der IFN- γ und TNF- α -Färbung der transferierten Zellen im Histogramm und *Dot-Plot*. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen; n.s., nicht stimuliert.

In Abbildung 5.18 ist die Produktion von IFN- γ und TNF- α von Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse dargestellt. Hierzu wurden die Milzzellen nach Reinigung wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid, auf das alle OT-I Zellen reagieren sollten, stimuliert. Als Kontrollen dienten ein Ansatz ohne stimulierende Substanzen und ein Ansatz mit PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) und Ionomycin. PMA und Ionomycin dienten zur polyklonalen, T-Zellrezeptor-unabhängigen Stimulation der T-Zellen. Die Analyse der IFN- γ und TNF- α -Produktion zeigte, dass nicht-stimulierte Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen nur sehr wenig dieser Zytokine produzierten. Vor dem Transfer der OT-I CD8⁺ T-Zellen induzierte die Stimulation mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid in ca. 10 % der Wildtyp und CXCR6-defizienten Zellen IFN- γ und in ca. 15 % TNF- α . Nach dem Transfer der Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in mit *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Mäuse stieg der Anteil an Zellen, die Zytokine produzierten, massiv an. 50 bis 70 %

der transferierten Zellen synthetisierten nun IFN- γ und 30-50 % produzierten TNF- α . Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte gab es einen Unterschied zwischen den Wildtyp und den CXCR6-defizienten Zellen (Abb. 5.18 A). Abbildung 5.18 B zeigt beispielhaft die IFN- γ und TNF- α -Färbung der transferierten Zellen sowohl ohne Stimulation als auch nach Stimulation mit dem immundominanten Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ und nach polyklonaler Stimulation mit PMA und Ionomycin.

Es konnte gezeigt werden, dass Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse eine ähnliche Frequenz von Zytokinproduzenten aufwiesen. An keinem der untersuchten Zeitpunkte unterschied sich der Anteil an IFN- γ und TNF- α -produzierenden Zellen. Dies ist einerseits ein Hinweis darauf, dass CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen nicht verstärkt in den Zustand der *Exhaustion* geraten und andererseits, dass sie die Fähigkeit besitzen sich zu vollwertigen CD8⁺ T-Effektorzellen zu entwickeln.

5.5.6 Vergleich der Aktivierung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer

Für die weitere Analyse der transferierten OT-I CD8⁺ T-Zellen wurde der Aktivierungszustand der Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse untersucht. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD44 und CD62L korreliert unter anderem mit dem Differenzierungs- und Aktivierungsstadium von CD8⁺ T-Zellen. Wie bereits beschrieben exprimieren naive CD8⁺ T-Zellen CD62L jedoch kein CD44. Zentrale Gedächtniszellen sind CD44⁺CD62L⁺ und Effektorzellen sind nur CD44-positiv und exprimieren kein CD62L [8, 9].

In Abbildung 5.19 ist der Aktivierungsstatus der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber dargestellt. Vor dem Transfer besaßen Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen ein vergleichbares Expressionsprofil für CD44 und CD62L. Ungefähr 80 % der Zellen hatten einen naiven Phänotyp und waren CD44⁻CD62L⁺. Die restlichen Zellen teilten sich gleichmäßig in zentrale Gedächtniszellen (CD44⁺CD62L⁺) und Effektorzellen (CD62L⁻) auf. Fünf Wochen nach dem kompetitiven Transfer waren sowohl in der Milz als auch in der Leber Wildtyp und CXCR6-defiziente Zellen phänotypisch stark aktiviert. In der Milz hatten 40 % der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten Zellen den Phänotyp von Effektorzellen und exprimierten kein CD62L. Die restlichen 60 % der Zellen waren positiv für CD44 und CD62L. Der Phänotyp von Wildtyp und CXCR6-defizienten unterschied sich nicht. Bis fünfzehn Wochen nach dem Transfer nahm der Anteil an Effektorzellen wieder deutlich ab und in der Milz waren 80 bis 90 % der Zellen zentrale Gedächtniszellen. In der Leber lag der Anteil an zentralen Gedächtniszellen zwischen 60 und 70 %. Phänotypisch naive T-Zellen konnten in beiden Organen erst wieder dreißig Wochen nach dem Transfer nachgewiesen werden. An keinem der untersuchten Zeitpunkte gab es signifikante Unterschiede in der Expression von CD44 und CD62L zwischen den Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-

Zellen (Abb. 5.19 A). Abbildung 5.19 B zeigt als Beispiel die Expression von CD44 und CD62L auf den transferierten Zellen.

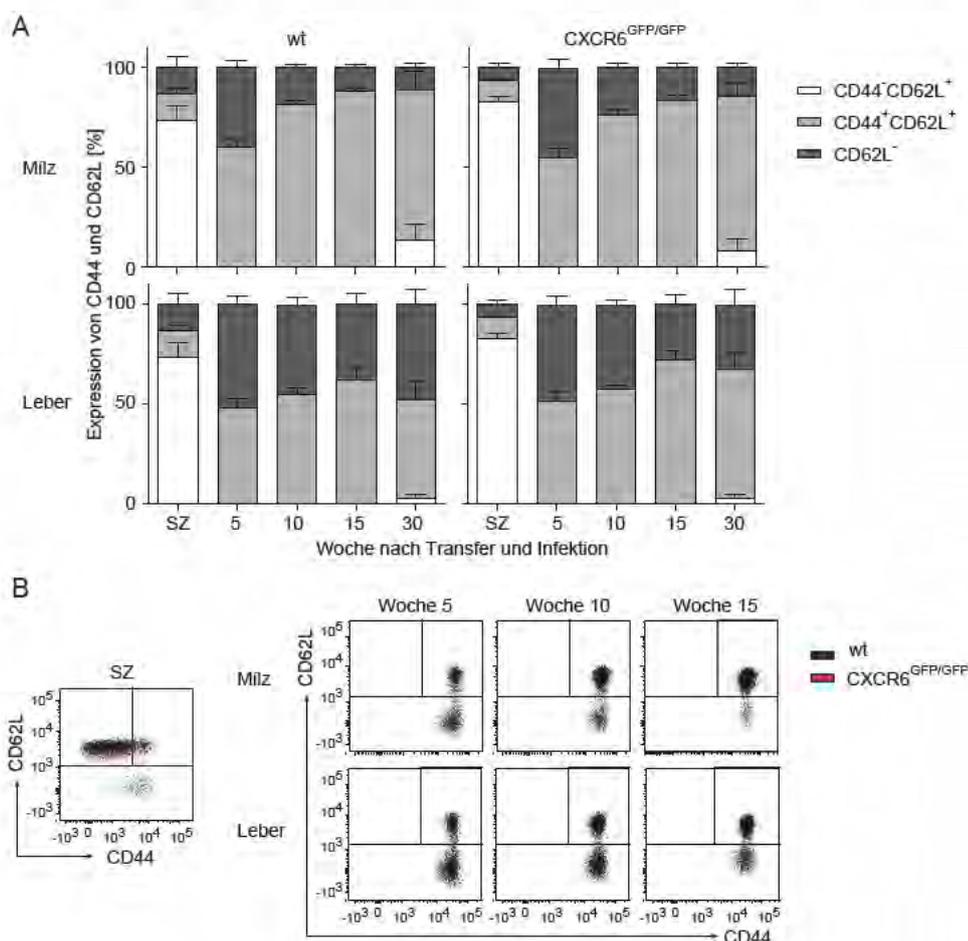


Abbildung 5.19: Aktivierungsstatus von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1^{-/-} Mäuse. Je 25.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} OT-I CD8⁺ T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1^{-/-} Empfängermäuse injiziert. Fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Wochen *p.i.* wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber der Empfängermäuse isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 6$) dar. (A) Expression von CD44 und CD62L auf den transferierten Zellen. (B) Beispielhafte Darstellung der Expression von CD44 und CD62L auf den transferierten Zellen im *Dot-Plot*. wt, Wildtyp; SZ, Spenderzellen.

Zusammenfassend konnte in der Analyse der transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in RAG1^{-/-} Mäuse gezeigt werden, dass die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 die Verteilung und die Aufrechterhaltung der CD8⁺ T-Zellpopulationen beeinflusst. Im Verlauf der Beobachtungsperiode nahm der Anteil an transferierten CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen verglichen mit dem Anteil der transferierten Wildtyp OT-I CD8⁺ T-Zellen in allen untersuchten Organen außer dem Knochenmark ab. Als Ursache dafür konnte eine verminderte Proliferation der CXCR6-defizienten Zellen ermittelt werden. Ein Zusam-

menhang zwischen der verminderten Proliferationsrate der CXCR6-defizienten Zellen mit der *Exhaustion*, also der Ausgezehrtheit und Erschöpfung, konnte aber nicht festgestellt werden. Obwohl die Expression von PD-1 auf CXCR6-defizienten Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen leicht erhöht war, zeigten die Wildtyp Zellen eine gesteigerte Expression von LAG3 und CD244. PD-1, LAG3 und CD244 sind typische Moleküle, die im Zustand der *Exhaustion* auf T-Zellen exprimiert werden. Weitere Merkmale der *Exhaustion* sind gesteigerte Apoptose und verminderte Funktionalität. Die Analyse der Apoptose und der Funktionalität, also der Produktion von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α , ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den CXCR6-defizienten und Wildtyp Zellen. Der Aktivierungsstatus der transferierten Zellen war auch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte unterschiedlich. Obwohl die transferierten CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen weniger stark proliferieren besaßen sie einen vergleichbaren Differenzierungsstatus und eine identische Funktionalität.

5.6 Überleben und Proliferation von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen *in vitro*

Im vorangehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass CXCR6-defiziente CD8⁺ T-Zellen bei der Beobachtung über einen Zeitraum von mehreren Wochen einen Proliferationsdefekt aufwiesen. Im letzten Teil dieser Arbeit sollten daher die Mechanismen dieses Defekts in Zellkulturansätzen aufgeklärt werden. Dazu wurden die Milzen aus Wildtyp und CXCR6-defizienten C57BL/6 Mäusen entnommen und die Lymphozyten isoliert. Die Wildtyp und CXCR6-defizienten Zellen wurden anhand des CD8⁺ T-Zellanteils zu gleichen Anteilen gemischt und insgesamt 4×10^5 Zellen für die *in vitro* Stimulation (siehe Kap. 4.6.2) eingesetzt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von CXCL16 und IL-15 stimuliert. IL-15 kontrolliert die Proliferation und das Überleben von Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen [71] und diente als direkter Vergleich für potentiell ähnliche Eigenschaften von CXCL16. Als weitere Kontrollen wurden ein Ansatz ohne stimulierende Substanzen und ein Ansatz, der aktivierende α CD3 und α CD28 Antikörper enthielt, durchgeführt. Als Nachweis der Proliferation diente die Färbung mit dem Zell-Proliferationsfarbstoff eFluor 670 (siehe Kap. 4.8). Bei einer Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes halbiert sich dabei [72]. Es wurde drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert.

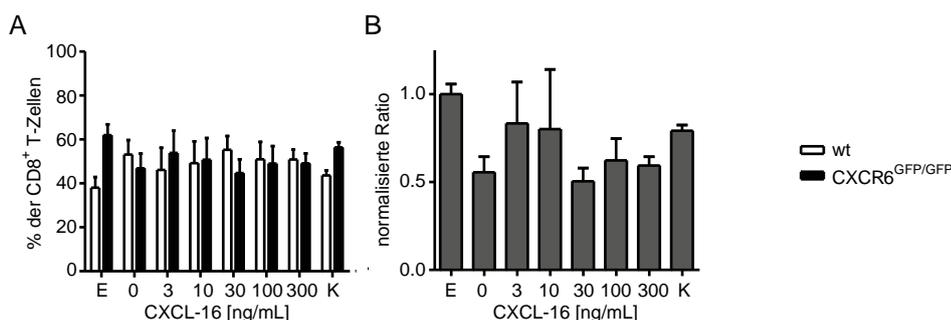


Abbildung 5.20: Verhältnis von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit CXCL16. Je 20.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} T-Zellen aus den Milzen von kongenen C57BL/6 Mäusen wurden anhand des CD8⁺ T-Zellanteils zu gleichen Anteilen gemischt und *in vitro* mit den angegebenen Mengen an CXCL16 stimuliert. Drei Tage später wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (n=4) dar. (A) Prozentualer Anteil der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen. (B) Normalisierte Ratio der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen. Die normalisierte Ratio ist die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen, die auf das Verhältnis der Verteilung der eingesetzten Zellen normalisiert wurde. wt, Wildtyp; E, eingesetzte Zellen; K, Kontrolle (Stimulation mit 2 μ g/mL α CD3 und α CD28 Antikörper).

Abbildung 5.20 zeigt das Verhältnis von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit CXCL16. Um Unterschiede in der Verteilung besser sichtbar zu machen wurde die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen berechnet und auf das Verhältnis der Verteilung der eingesetzten Zellen normalisiert. Ohne stimulierende Substanzen erreichte die normalisierte Ratio einen Wert von ungefähr 0,5. Das bedeutet, dass verglichen mit der Ausgangsverteilung der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen größer war als der Anteil an CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Der Unterschied war aber nicht signifikant (Abb. 5.20 B). Durch Zugabe von CXCL16 in ansteigenden Konzentrationen von 3 bis 300 ng/mL änderte sich die Verteilung der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen ebenfalls nicht signifikant (Abb. 5.20 A) und die normalisierte Ratio hatte Werte zwischen 0,5 und 0,8 (Abb. 5.20 B). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass das Überleben oder die Proliferation von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich war, da in allen untersuchten Ansätzen der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen verglichen mit den CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen größer war. Auch bei der polyklonalen T-Zellstimulation durch α CD3 und α CD28 Antikörper konnte beobachtet werden, dass die Wildtyp CD8⁺ T-Zellen einen leichten Vorteil in Bezug auf Überleben oder Proliferation gegenüber den CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen hatten, da auch bei diesem Ansatz die normalisierte Ratio einen Wert von ca. 0,8 hatte (Abb. 5.20 B).

Um zu klären, ob die Unterschiede in der Verteilung der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen auf Unterschieden in der Proliferation beruhten, wurde die Abnahme des Zellproliferationsfarbstoffs eFluor 670 gemessen. Als weiterer Parameter wurde die Blastentransformation der Zellen bestimmt. Die Blastenbildung kann durchflusszytometrisch mit Hilfe des FSC (*Forward Scatter*) bestimmt werden.

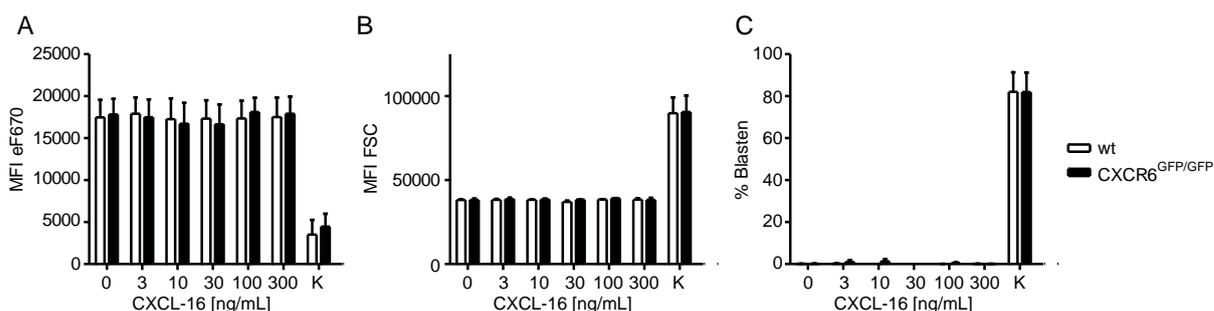


Abbildung 5.21: Proliferation und Blastenbildung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit CXCL16. Je 20.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} T-Zellen aus den Milzen von kongenen C57BL/6 Mäusen wurden anhand des CD8⁺ T-Zellanteils zu gleichen Anteilen gemischt und mit dem Zell-Proliferationsfarbstoff eFluor 670 gefärbt. Die Zellen wurden *in vitro* mit den angegebenen Mengen an CXCL16 stimuliert und drei Tage später durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (n=4) dar. (A) Mittlere Fluoreszenzintensität der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen für die eFluor 670-Färbung. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen für den FSC. (C) Prozentualer Anteil an Blasten. wt, Wildtyp; MFI, Mittlere Fluoreszenzintensität; FSC, *Forward Scatter*, I, Tag 0; K, Kontrolle (Stimulation mit 2 μ g/mL α CD3 und α CD28 Antikörper).

In Abbildung 5.21 ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eFluor 670-Färbung, sowie die MFI des FSC und der prozentuale Anteil an Blasten der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit CXCL16 dargestellt. Ohne stimulierende Substanzen und nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an CXCL16 sowie nach T-Zellrezeptorstimulation gab es keine Unterschiede in der MFI von eFluor 670 zwischen Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL16 keine Proliferation von CD8⁺ T-Zellen induziert, da die MFI von eFluor 670 der CD8⁺ T-Zellen auch nach Stimulation mit CXCL16 verglichen mit dem Ansatz ohne stimulierende Substanzen unverändert blieb. Die T-Zellrezeptorstimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 hingegen induzierte eine Proliferation der CD8⁺ T-Zellen. Die MFI von eFluor 670 der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen sank von ca. 17500 ohne Stimulation auf unter 5000 (Abb. 5.21 A). Die Blastentransformation der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen unterschied sich unabhängig von der Stimulation ebenfalls nicht und CXCL16 konnte auch keine Blasten in CD8⁺ T-Zellen induzieren. Die MFI des FSC veränderte sich nach Stimulation mit unterschiedlichen CXCL16 Konzentrationen nicht und behielt einen Wert von ca. 38000. Nur durch T-Zellrezeptorstimulation konnte eine deutliche Blastenbildung der CD8⁺ T-Zellen ausgelöst werden. Die MFI des FSC stieg auf ca. 90000 (Abb. 5.21 B). Der prozentuale Anteil an Blasten betrug 80 % (Abb. 5.21 C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL16 keine Proliferations- und Blasten-induzierende Eigenschaften auf CD8⁺ T-Zellen hatte. Unabhängig von der CXCL16 Konzentration, mit der die CD8⁺ T-Zellen stimuliert wurden, war der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen verglichen mit dem Anteil an CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen etwas größer.

Auch nach T-Zellrezeptorstimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 war der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen etwas größer. Da keine Unterschiede in der MFI von eFluor 670 und des FSC sowie dem prozentualen Anteil an Blasten nachgewiesen werden konnten, können Unterschiede in der Proliferation und im Wachstum der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Analyse der Proliferation von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen wurden die Zellen mit dem Zytokin IL-15 stimuliert. IL-15 kontrolliert die Proliferation und das Überleben von Gedächtnis-CD8⁺-T-Zellen [71].

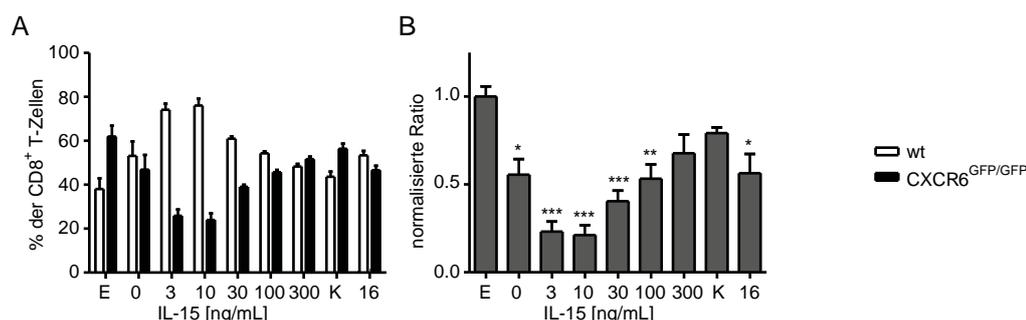


Abbildung 5.22: Verhältnis von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit IL-15. Je 20.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} T-Zellen aus den Milzen von kongenen C57BL/6 Mäusen wurden anhand des CD8⁺ T-Zellanteils zu gleichen Anteilen gemischt und *in vitro* mit den angegebenen Mengen an IL-15 stimuliert. Drei Tage später wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (n=4) dar. (A) Prozentualer Anteil der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen. (B) Normalisierte Ratio der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen. Die normalisierte Ratio ist die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen, die auf das Verhältnis der Verteilung der eingesetzten Zellen normalisiert wurde. wt, Wildtyp; E, eingesetzte Zellen; K, Kontrolle (Stimulation mit 2 μ g/mL α CD3 und α CD28 Antikörper); 16, CXCL16 (Stimulation mit 100 ng/mL IL-15 und 100 ng/mL CXCL16); * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Abbildung 5.22 zeigt die Verteilung von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit IL-15. Um Unterschiede in der Verteilung besser sichtbar zu machen wurde auch hier die Ratio von CXCR6-defizienten zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen berechnet und auf das Verhältnis der Verteilung der eingesetzten Zellen normalisiert. Ohne Stimulation erreichte die normalisierte Ratio einen Wert von ungefähr 0,5. Das bedeutet, dass verglichen mit der Ausgangsverteilung der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen größer war als der Anteil an CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Der Unterschied war signifikant (Abb. 5.22 B). Durch Zugabe von IL-15 in ansteigenden Konzentrationen von 3 bis 300 ng/mL änderte sich die Verteilung der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit niedrigen Konzentrationen von IL-15 (3 und 10 ng/mL) führte zu einem starken Vorteil der Wildtyp CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.22 A). Der Wert der normalisierten Ratio lag bei ca. 0,25. Der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen war fast drei Mal so groß wie der Anteil an CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Durch Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit moderaten Konzentrationen von IL-15 (30 und 100 ng/mL) erreichte die normalisierte Ratio Werte zwischen 0,4 und 0,6. Auch hier wa-

ren die Unterschiede zur Verteilung der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen an Tag 0 signifikant unterschiedlich (Abb. 5.22 B). Nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit einer hohen Konzentration an IL-15 (300 ng/mL) hatte die normalisierte Ratio einen Wert von ca. 0,7. Obwohl der Unterschied nicht signifikant war deutet dieses Ergebnis auf einen leichten Vorteil der Wildtyp CD8⁺ T-Zellen gegenüber der CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen hin (Abb. 5.22 B). Auch in diesem Assay diente ein Ansatz mit T-Zellrezeptor-stimulierenden Antikörpern gegen die Proteine CD3 und CD28 als Kontrolle. Bei dieser polyklonalen T-Zellrezeptorstimulation konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Wildtyp CD8⁺ T-Zellen einen leichten Vorteil gegenüber den CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen hatten, da die normalisierte Ratio einen Wert von ca. 0,8 hatte (Abb. 5.22 B). Ein letzter Ansatz diente der Untersuchung der stimulierenden Eigenschaften von IL-15 und CXCL16 zusammen. Es wurden Konzentrationen von 100 ng/mL für IL-15 und CXCL16 eingesetzt. Die normalisierte Ratio hatte einen Wert von ca. 0,6 und war somit identisch zu dem Wert der Stimulation nur mit 100 ng/mL IL-15. CXCL16 scheint die stimulierenden Eigenschaften von IL-15 nicht direkt zu beeinflussen (Abb. 5.22 B). Um zu klären, ob die Unterschiede in der Verteilung der Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen auf Unterschiede in der Proliferation beruhen, wurden die Zellen einerseits vor der Stimulation mit dem Zell-Proliferationsfarbstoff eFluor 670 gefärbt und nach der Stimulation die Proliferation anhand der Abnahme der MFI analysiert. Andererseits wurde die Blastenbildung der Zellen mit Hilfe der MFI des FSC ermittelt.

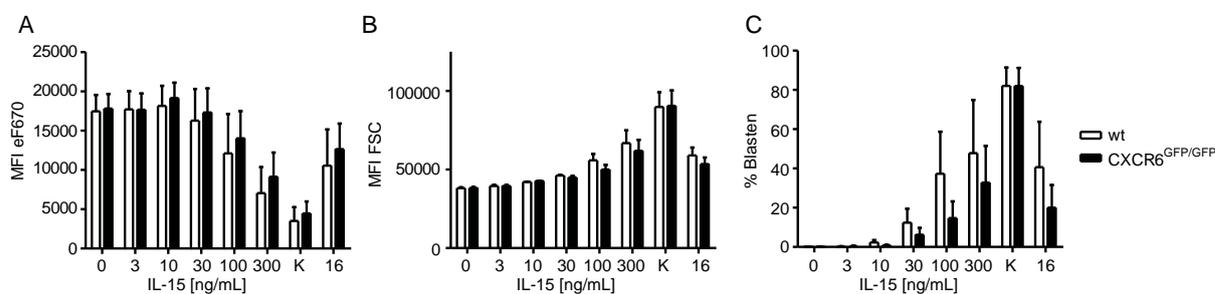


Abbildung 5.23: Proliferation und Blastenbildung von Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit IL-15. Je 20.000 Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} T-Zellen aus den Milzen von kongenen C57BL/6 Mäusen wurden anhand des CD8⁺ T-Zellanteils zu gleichen Anteilen gemischt und mit dem Zell-Proliferationsfarbstoff eFluor 670 gefärbt. Die Zellen wurden *in vitro* mit den angegebenen Mengen IL-15 stimuliert und drei Tage später durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (n=4) dar. (A) Mittlere Fluoreszenzintensität der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen für die eFluor 670-Färbung. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der Wildtyp und CXCR6^{GFP/GFP} CD8⁺ T-Zellen für den FSC. (C) Prozentualer Anteil an Blasten. wt, Wildtyp; MFI, Mittlere Fluoreszenzintensität; FSC, *Forward Scatter*, I, Tag 0; K, Kontrolle (Stimulation mit 2 μ g/mL α CD3 und α CD28 Antikörper); 16, CXCL16 (Stimulation mit 100 ng/mL IL-15 und 100 ng/mL CXCL16).

In Abbildung 5.23 ist die MFI der eFluor 670-Färbung, sowie die MFI des FSC und der prozentuale Anteil an Blasten von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen nach *in vi-*

tro Stimulation mit IL-15 dargestellt. Ohne stimulierende Substanzen und nach Stimulation mit niedrigen Konzentrationen an IL-15 (3 und 10 ng/mL) gab es keine Unterschiede in der MFI von eFluor 670 zwischen Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Unter diesen Bedingungen zeigten die CD8⁺ T-Zellen keine Proliferation. Nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit moderaten und hohen Konzentrationen an IL-15 (30-100 ng/mL), sowie nach T-Zellrezeptorstimulation proliferierten Wildtyp CD8⁺ T-Zellen etwas stärker als CXCR6-defiziente CD8⁺ T-Zellen. Dies ist an einer größeren Abnahme der MFI von eFluor 670 bei den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen zu erkennen. Die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit IL-15 zusammen mit CXCL16 führte ebenfalls zu einer leicht gesteigerten Proliferation der Wildtyp CD8⁺ T-Zellen. Die Werte der MFI waren mit denen nach Stimulation mit 100 ng/mL IL-15 vergleichbar (Abb. 5.23 A). Die MFI des FSC veränderte sich in Korrelation mit den MFI von eFluor 670. Ohne stimulierende Substanzen und nach Stimulation mit niedrigen Konzentrationen an IL-15 (3 und 10 ng/mL) gab es keine Unterschiede in der MFI des FSC zwischen Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen, da die Zellen unter diesen Bedingungen noch nicht proliferierten. Ab IL-15 Konzentrationen von 30 ng/mL begannen die CD8⁺ T-Zellen zu proliferieren und somit auch Blasten zu bilden. Die MFI des FSC erhöhte sich abhängig von der IL-15 Konzentration. Nach Stimulation mit 100 und 300 ng/mL reagierten die Wildtyp CD8⁺ T-Zellen verglichen mit den CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen etwas stärker, was an einer etwas höheren MFI des FSC der Wildtyp CD8⁺ T-Zellen zu erkennen ist. Die T-Zellrezeptorstimulation induzierte die stärkste Blastenbildung, es gab aber keine Unterschiede zwischen Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit IL-15 zusammen mit CXCL16 verhielten sich die Zellen wie nach Stimulation nur mit 100 ng/mL IL-15 (Abb. 5.23 B). Der prozentuale Anteil an Blasten veränderte sich ebenfalls in Korrelation zu MFI von eFluor 670 und FSC. Nur nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit moderaten und hohen Konzentrationen an IL-15 konnten Blasten nachgewiesen werden und der prozentuale Anteil an Blasten von den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen war verglichen mit den CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen größer. Die T-Zellrezeptorstimulation führte zu einem sehr hohen aber gleichen Anteil an Blasten von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Die Stimulation mit IL-15 und CXCL16 verlief vergleichbar zur Stimulation nur mit 100 ng/mL IL-15 (Abb. 5.23 C).

Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass das Zytokin IL-15 ab moderaten Konzentrationen (ab 30 ng/mL) die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen induzierte. Unter diesen Bedingungen waren die Wildtyp CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen im Vorteil. Wildtyp CD8⁺ T-Zellen teilten sich häufiger als CXCR6-defiziente CD8⁺ T-Zellen und ihr Anteil an Blasten war größer. Die kombinierte Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit IL-15 und CXCL16 ergab weder einen steigernden noch einen hemmenden Einfluss von CXCL16 auf die IL-15 Wirkung auf CD8⁺ T-Zellen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL16 nicht in der Lage ist Proliferation und Wachstum bei CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Ohne stimulierende Substanzen und

nach Stimulation mit IL-15 oder Antikörpern gegen CD3 und CD28 wiesen CXCR6-defiziente CD8⁺ T-Zellen jedoch einen Überlebensnachteil gegenüber den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen auf. Der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen war unter allen getesteten Bedingungen nach drei Tagen *in vitro* Kultur größer als der Anteil der CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. IL-15 vergrößerte den Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen verglichen mit CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen vor allem bei niedrigen Konzentrationen, die noch keine Proliferation induzierten, drastisch. Auch bei Konzentration von IL-15, die zu einer Proliferation führten, war ein Nachteil der CXCR6-defizienten in Proliferation und Blastenbildung sichtbar. Zusammenfassend scheinen CXCR6-defiziente CD8⁺ T-Zellen verglichen mit Wildtyp CD8⁺ T-Zellen, unabhängig von der Induktion eines Signals durch das Chemokin CXCL16 über den Chemokinrezeptor CXCR6, *in vitro* einen Überlebensnachteil zu haben und vermindert auf IL-15 zu reagieren.

6 Diskussion

Die Leber ist neben der Milz eines der Zielorgane von *Listeria monocytogenes*. In der Maus führt die Infektion mit Listerien zu einer massiven Akkumulation von T-Zellen in der Leber. Für die Kontrolle der Listerieninfektion sind T-Zellen, vor allem CD8⁺ T-Zellen, entscheidend. Da in der Leber keine T-Zellantworten generiert werden können [80], muss die T-Zellakkumulation auf der Rekrutierung von Effektor-T-Zellen, die in Lymphgeweben gebildet wurden, beruhen. Aufgrund der relativ guten Zugänglichkeit der Leber für T-Zellen, können auch im gesunden Zustand naive, Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen während der normalen homöostatischen Zirkulation in dieses Organ gelangen [81, 82]. Während einer Infektion treten inflammatorische Migrationsprozesse in den Vordergrund. Sie überlagern die homöostatischen Mechanismen und ermöglichen T-Zellen gezielt zum Ort der Infektion in die Leber zu gelangen. Neben der verstärkten Expression von Integrin-Liganden auf portalen und sinusoidalen Endothelien in der Leber [83, 84], kommt es während entzündungsbedingter Migrationsprozessen auch zur verstärkten Expression von inflammatorischen Chemokinen [85].

Die Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Zellen und die Produktion von Chemokinen in infizierten Geweben regeln die gerichtete Bewegung von T-Zellen zum Zielort und verteilen Immunzellen im Organismus. Im *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell sind die Mechanismen der Migration von aktivierten T-Zellen in die Leber nur unzureichend bekannt und für die Beteiligung von Chemokin- und Chemokinrezeptor-Systemen gibt es nur wenige und zum Teil widersprüchliche Studien [86, 87, 88]. Unveröffentlichte mRNA Expressionsanalysen ergaben, dass *Listeria monocytogenes*-spezifische CD8⁺ T-Zellen relativ hohe Level für die Chemokinrezeptoren CXCR6, CXCR3, CCR5 und CCR2, sowie moderate Level für die mRNA von CCR6 zeigten. Die hohe Expression des Chemokins CXCL16 in sinusoidalen Endothelien der Leber [89] machte vor allem die Untersuchung des Chemokinrezeptors CXCR6 interessant. In dieser Arbeit sollte die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR6 in der Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* untersucht werden.

6.1 Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Oberflächenexpression von CXCR6 auf verschiedenen CD8⁺ T-Zellpopulationen aus Milz und Leber im Verlauf der Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* charakterisiert. In Reporter-mäusen (CXCR6^{+/GFP}) wurde anhand der GFP-Expression

die Expression von CXCR6 untersucht. Diese Mäuse wurden mit Listerien infiziert und CD8⁺ T-Zellen und insbesondere aktivierte CD8⁺ T-Zellen, sowie Listerien-spezifische CD8⁺ T-Zellen auf ihre Expression von CXCR6 untersucht.

In dieser Arbeit wurde ein typischer Verlauf der CD8⁺ T-Zellantwort während einer Listerieninfektion [90] gezeigt. Der prozentuale Anteil und auch die Anzahl an CD8⁺ T-Zellen erreichten sieben bis neun Tage nach der Infektion ihr Maximum. Vor allem in der Leber fand eine massive CD8⁺ T-Zellakkumulation statt. In der Milz verdoppelte sich die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen, während in der Leber sogar zehnmal so viele CD8⁺ T-Zellen verglichen mit naiven Mäusen detektiert wurden. Zu diesem Zeitpunkt erreichten aktivierte und Listerien-spezifische CD8⁺ T-Zellen ebenfalls ihr Maximum. Bis zum Ende unserer Untersuchungen an Tag 14 war eine deutliche Reduktion der gesamten CD8⁺ T-Zellpopulation, aber auch der aktivierten und Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu beobachten.

Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 korrelierte mit der Listerieninfektion. Nach der Infektion stieg der Anteil an CXCR6-exprimierenden CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber bis zum Ende unserer Untersuchungen an Tag 14 kontinuierlich an. Vor allem CD8⁺ T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp exprimierten CXCR6. Der Anteil an CXCR6-positiven aktivierten CD8⁺ T-Zellen lag in der Leber bereits in naiven Mäusen bei 80 % und war somit deutlich höher als in der Milz. Aufgrund des größeren Anteils an CXCR6-exprimierenden CD8⁺ T-Zellen in der Leber deuten diese Ergebnisse auf eine Funktion von CXCR6 in der Leber hin. Da fast alle aktivierten CD8⁺ T-Zellen in der Leber CXCR6-positiv waren, könnte CXCR6 ein entscheidendes Signal für die Migration dieser Zellen in die Leber liefern.

Im Vergleich zu phänotypisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen wurde in dieser Arbeit eine veränderte Expressionskinetik für Listerien-spezifische T-Zellen beobachtet. Während der Anteil an IFN- γ -positiven CD8⁺ T-Zellen zwischen Tag 7 und Tag 9 nach Infektion ihr Maximum erreichte, stieg der Anteil an CXCR6-positiven Zellen innerhalb dieser Population bis zum Ende meiner Untersuchungen an Tag 14 weiter an. Das bedeutet also, dass die Expression von CXCR6 verglichen mit der Expression von IFN- γ verzögert eintrat. Listerien-spezifische CD8⁺ T-Zellen erwerben scheinbar die Fähigkeit zur IFN- γ -Produktion vor der CXCR6-Expression. Interessanterweise war jedoch der Anteil an CXCR6-positiven Zellen innerhalb der Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber etwa gleich. Es gab also im Gegensatz zur phänotypisch aktivierten CD8⁺ T-Zellpopulation keine bevorzugte Expression von CXCR6 auf Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Leber.

Insgesamt wurde eine Anreicherung von CXCR6-positiven CD8⁺ T-Zellen in der Leber beobachtet. Die CD8⁺ T-Zellpopulation, die im Rahmen der Listerieninfektion generiert wurde, zeigte jedoch eine verzögerte CXCR6-Expression und die Akkumulation dieser Zellen war unabhängig von CXCR6. Dies würde bedeuten, dass Listerien-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der akuten Infektion CXCR6 zur Migration in die Leber nicht benötigen. Generell ist bei den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch zu beachten, dass meine Daten auf der Messung der Expression

von GFP an Stelle von CXCR6 beruhen. Zu den frühen Zeitpunkten mag die CXCR6-Expression sehr gut mit der GFP-Expression übereinstimmen, beide Proteine könnten aber unterschiedliche Halbwertszeiten besitzen. Chemokinrezeptoren werden weiterhin nach Aktivierung durch Ligandenbindung internalisiert und entweder wiederverwendet oder abgebaut [30]. Dieser Mechanismus kann durch die Expression von GFP nicht dargestellt werden. In der akuten Infektion, aber auch in späteren Beobachtungszeiträumen könnte daher die Expression von GFP von der tatsächlichen Expression von CXCR6 abweichen.

6.2 Die Relevanz von CXCR6 für die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes*

Für die Untersuchung der generellen Relevanz von CXCR6 für die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* wurde einerseits die Kontrolle der Listerien und andererseits die spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort gegen Listerien in CXCR6-defizienten Mäusen analysiert.

In infizierten Wildtyp und CXCR6-defizienten Mäusen wurde die Bakterienlast in Milz und Leber an Tag 3, Tag 5 und Tag 7 nach Infektion untersucht. In der Milz verlief die Kontrolle der Listerieninfektion unabhängig von dem Chemokinrezeptor CXCR6. In beiden Mausstämmen wurden an allen untersuchten Zeitpunkten ähnliche Bakterienbelastungen detektiert. In der Leber hingegen konnten CXCR6-defiziente Mäuse die Infektion sogar besser kontrollieren. CXCR6-defiziente Mäuse weisen eine stark verminderte Anzahl an CD1d-reaktiven NKT-Zellen in der Leber auf [89]. Dieser Mangel an NKT-Zellen könnte die Kontrolle der Listerieninfektion in der Leber beeinflussen. Interessanterweise sind die publizierten Daten zur Rolle von NKT-Zellen in der Listerieninfektion widersprüchlich. Einerseits zeigen CD1d-defiziente Mäuse nach einer Listerieninfektion zu frühen Zeitpunkten eine leicht verminderte Kontrolle der Infektion in Milz und Leber [91]. Andererseits überleben Wildtyp Mäuse nach Behandlung mit α CD1-Antikörpern besser, als die Tiere, die mit Kontrollantikörpern behandelt wurden [92]. Weiterhin ist bekannt, dass NKT-Zellen nicht nur eine proinflammatorische Funktion haben, sondern Immunantworten auch hemmen können [93, 94, 95, 96]. Die niedrigeren Listerientiter in den Lebern von CXCR6-defizienten Mäusen könnten daher auf einer fehlenden Hemmung der Immunantwort durch NKT-Zellen beruhen. In der Milz liegen im Gegensatz zur Leber nur relativ geringe Zahlen an NKT-Zellen vor. Der dadurch begründete geringere Einfluss dieser Zellen auf die Immunantwort würde zu den vergleichbaren Listerientitern in den Milzen von Wildtyp und CXCR6-defizienten Mäusen passen.

Zur Analyse der T-Zellantwort wurden Kontroll- und CXCR6-defiziente Mäuse mit *LmOVA* infiziert und acht Tage nach der Primärinfektion bzw. fünf Tage nach der Sekundärinfektion wurde die Anzahl an Listerien-spezifischen T-Zellen bestimmt. Lymphozyten aus Milz und Leber wurden mit den immundominanten Peptiden LLO₁₈₉₋₂₀₁(CD4) und OVA₂₅₇₋₂₆₄ (CD8) stimuliert und die spezifischen Zellen anhand der IFN- γ Produktion identifiziert. Während der pri-

mären Immunantwort in der Milz war die Anzahl an Listerien-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in den CXCR6-defizienten Mäusen verglichen mit den Kontroll-Mäusen signifikant größer. Auch die Anzahl an Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen war in diesen Tieren leicht erhöht, jedoch nicht signifikant unterschiedlich. In der Leber fanden sich die gleichen Unterschiede in der primären Immunantwort, aber insgesamt weniger stark ausgeprägt als in der Milz. Im Gegensatz dazu waren die T-Zellantworten nach Sekundärinfektion sowohl in der Milz, als auch in der Leber zwischen beiden Mausstämmen identisch. Die bereits beschriebene verminderte Anzahl an CD1d-reaktiven NKT-Zellen in CXCR6-defizienten Mäusen und die damit verminderte Hemmung der Immunantwort könnte auch für die höhere Anzahl an spezifischen T-Zellen verantwortlich sein. Im Widerspruch dazu stehen aber die größeren Unterschiede in der Milz und die fehlenden Unterschiede in der Sekundärantwort. Anhand der Gewebeverteilung von NKT-Zellen wären stärkere Unterschiede in der Leber zu erwarten und das Fehlen der NKT-Zellen in CXCR6-defizienten Mäusen sollte auch eine Auswirkung auf die Sekundärantwort haben. Insgesamt geben die erhobenen Daten keine Hinweise für eine entscheidende Funktion von CXCR6 während der T-Zellantwort gegen *Listeria monocytogenes*. CXCR6-defiziente Mäuse können sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ T-Zellantworten ausbilden und diese Antworten sind in der Primärinfektion sogar etwas stärker als in den Wildtyp Mäusen. Auch in der Leber zeigten CXCR6-defiziente Tiere eine normale T-Zellantwort. Das Fehlen von CXCR6 hatte daher keinen Einfluss auf die Akkumulation von spezifischen T-Zellen in der Leber, die Rekrutierung in die Leber verlief demzufolge unabhängig von CXCR6. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Veröffentlichungen in denen gezeigt wurde, dass CXCR6 zwar auf verschiedenen CD4⁺ T-Zellpopulationen exprimiert wird, jedoch nicht essentiell zur Migration dieser Zellen beiträgt [40] und, dass die Blockade der CXCL16/CXCR6 Interaktion nicht die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T-Zellen inhibiert [97].

6.3 Migration und Verteilung von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen

Für die detaillierte Analyse der Funktion von CXCR6 für CD8⁺ T-Zellen wurden im nächsten Teil dieser Arbeit kompetitive T-Zelltransferexperimente durchgeführt. Dazu wurde ein Gemisch aus transgenen Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in die selbe Empfängermaus übertragen. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass beide CD8⁺ T-Zellpopulationen einem identischen Wildtypumfeld ausgesetzt sind. Weiterhin ist der kompetitive T-Zelltransfer sehr sensitiv und ermöglicht den Nachweis von geringen Unterschieden in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. OT-I CD8⁺ T-Zellen erkennen Ovalbumin aus *LmOVA* und sollten daher nach Infektion der Empfängermause aktiviert werden. Drei und fünf Tage nach der Infektion der Empfängermause und dem kompetitiven Transfer der Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen wur-

de die Verteilung und Aktivierung der transferierten Zellen in Milz und Leber analysiert. Drei Tage nach dem kompetitiven Transfer konnte eine deutliche Anreicherung der CXCR6-defizienten Zellen in der Milz nachgewiesen werden. Diese Zellen wanderten aber, verglichen mit den Wildtyp Zellen, nur in geringem Umfang in die Leber ein. An Tag 5 wurde eine gleichmäßige Verteilung der beiden T-Zellpopulationen in Milz und Leber der Empfängermäuse detektiert. Das Ergebnis für Tag 5 passt hingegen zu den vergleichbaren endogenen CD8⁺ T-Zellantworten, die an Tag 8 nach Infektion in Milz und Leber von Wildtyp und CXCR6-defizienten Tieren beobachtet werden konnten.

In den Transferexperimenten wurde auch der Aktivierungsstatus der Zellen in Milz und Leber anhand der CD44 und CD62L, sowie der KLRG1 Expression untersucht. Drei Tage nach dem Transfer fand sich eine deutlich verminderte Akkumulation von CXCR6-defizienten Zellen mit aktiviertem Phänotyp in der Leber. An Tag 5 war der Aktivierungsstatus der beiden CD8⁺ T-Zellpopulationen in der Leber identisch und in der Milz wurden zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zwischen den transferierten Wildtyp und CXCR6-defizienten Zellen Unterschiede detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass vor allem die Akkumulation von aktivierten CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen in der Leber drei Tage nach dem kompetitiven Transfer vermindert ist. Der Chemokinrezeptor CXCR6 scheint vor allem in der frühen Phase der Infektion für die Migration von aktivierten CD8⁺ T-Zellen in die Listerien-infizierte Leber wichtig zu sein.

In vitro wurde bereits gezeigt, dass der Chemokinrezeptor CXCR6 und sein Ligand CXCL16 in der Lage sind die Chemotaxis [98, 99] und die Adhäsion [100, 101] von unterschiedlichen Zellpopulationen zu beeinflussen. *In vivo* spielt die Expression von CXCR6 auf CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Migration dieser Zellen sechs Stunden nach Transfer in einem GvHD (*Graft-versus-Host Disease*)-Modell [60]. Da jedoch in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell CXCR6-defiziente CD8⁺ T-Zellen auch zu frühen Zeitpunkten (Tag 3) im geringen Umfang in der Lage waren in die Leber zu gelangen und zu späteren Zeitpunkten (Tag 5) keine eingeschränkte Akkumulation in der Leber aufwiesen, müssen neben CXCR6 andere Mechanismen für die Migration von CD8⁺ T-Zellen in die Listerien-infizierte Leber verantwortlich sein. Aufgrund von unveröffentlichten mRNA Expressionsanalysen, die zeigten, dass *Listeria monocytogenes*-spezifische CD8⁺ T-Zellen relativ hohe Level für die Chemokinrezeptoren CXCR6, CXCR3, CCR5 und CCR2 aufwiesen, könnten diese Rezeptoren CXCR6 ersetzen. Auch wurden CCR5-, CXCR3- und CXCR6-exprimierende Lymphozyten in den Lebern von Patienten mit Hepatitis C nachgewiesen [102, 103] und Kombinationen dieser drei Chemokinrezeptoren können auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen koexprimiert werden [65, 104]. Auf der anderen Seite zeigen unveröffentlichte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Mittrücker, dass die T-Zellantwort gegen *Listeria monocytogenes* in der Leber von CXCR3-defizienten Mäusen vergleichbar mit der von Kontrolltieren war. Bereits publizierte Ergebnisse für CXCR3 und CCR5 ergaben ebenfalls, dass diese Chemokinrezeptoren keine Rolle in der Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen in die Le-

ber spielt [87, 88]. Auch die Untersuchung von CCR5/CXCR3-doppeldefizienten Mäusen ergab keine weiteren Aufschlüsse über die Funktion dieser beiden Chemokinrezeptoren bei der Migration in Virus-infizierte Gewebe und der Kontrolle der Virusinfektion [105]. Ein Grund für die nicht nachweisbare Funktion einzelner Chemokinrezeptoren in der Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen in die Listerien-infizierte Leber könnte die Koexpression und Redundanz der Rezeptoren sein. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen in die Leber unabhängig von Chemokinen ist. Die Akkumulation von inflammatorischen Monozyten in die mit *Listeria monocytogenes* infizierte Leber wird in erster Linie durch Adhäsionsmoleküle gesteuert, Chemokine scheinen in diesem Prozess keine Rolle zu spielen [106]. Ein ähnlicher von Chemokinen unabhängiger Mechanismus könnte auch für die Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen verantwortlich sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR6 in der frühen Phase der Listerieninfektion wichtig für die Migration von CD8⁺ T-Zellen und hier insbesondere von aktivierten CD8⁺ T-Zellen in die Leber war. Zu späteren Zeitpunkten konnte das Fehlen von CXCR6 vermutlich durch andere Mechanismen wieder ausgeglichen werden.

6.4 Überleben von Wildtyp und CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen

Da der Chemokinrezeptor CXCR6 nicht nur als Protein zur Induktion von Chemotaxis beschrieben wurde, sondern auch eine Aufgabe im Überleben von NK-Zellen hat [107], wurde dieser Aspekt einerseits in kompetitiven T-Zelltransfermodellen und andererseits in Zellkulturansätzen untersucht. Wildtyp und CXCR6-defiziente OT-I CD8⁺ T-Zellen wurden kompetitiv in mit *Lm*OVA infizierte Mäuse transferiert. Als Empfängermäuse wurden RAG1-defiziente Mäuse verwendet. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass auch sehr späte Ereignisse nach dem T-Zelltransfer untersucht werden können, da eine Abstoßungsreaktion der transferierten Zellen durch endogene Immunzellen ausgeschlossen werden kann. Fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Wochen nach dem Transfer wurde die Verteilung der Wildtyp und CXCR6-defizienten OT-I CD8⁺ T-Zellen in unterschiedlichen Organen untersucht und die transferierten Zellen wurden hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktionen miteinander verglichen.

In fast allen untersuchten Organen war zu erkennen, dass der Anteil an transferierten CXCR6-defizienten Zellen verglichen mit den transferierten Wildtyp Zellen abnahm. Im Knochenmark hingegen blieb die Ausgangsverteilung der beiden CD8⁺ T-Zellpopulationen über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ stabil. In der Milz konnte dreißig Wochen nach dem Transfer eine signifikant verminderte Ratio zwischen beiden Populationen bestimmt werden. In Lunge und Blut erreichten die Werte der Ratio bereits zehn Wochen und in Lymphknoten und Leber schon fünf Wochen nach dem Transfer signifikant geringere Werte als der Ausgangswert. Der Anteil an CXCR6-defizienten Zellen nahm also in allen untersuchten Organen mit Ausnahme vom Knochenmark deutlich ab. Da in keinem Gewebe mehr CXCR6-defiziente Zel-

len gefunden wurden, beruht dieses Ergebnis wahrscheinlich nicht auf einem unterschiedlichen Migrationsverhalten, sondern auf einem Proliferations- oder Überlebensnachteil dieser Zellen. Eine Ursache könnte die Expression von GFP an Stelle von CXCR6 sein, die möglicherweise zu einer Hemmung der Zellen führt. Da die Veränderungen in der Akkumulation jedoch zu verschiedenen Zeitpunkten in den unterschiedlichen Organen auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von GFP an Stelle von CXCR6 keinen deutlichen Nachteil für die CXCR6-defizienten Zellen darstellt. Um die Proliferation der Zellen direkt zu bestimmen wurde der BrdU-Einbau gemessen. Mit dieser Methode zeigte sich eine verminderte Proliferation der CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen. Der Anteil an BrdU-einlagernden Zellen war aber sowohl für die Wildtyp, als auch für die CXCR6-defizienten Zellen insgesamt relativ hoch. RAG1-defiziente Mäuse enthalten keine B- und T-Lymphozyten. Der große Anteil an proliferierenden Zellen könnte darin begründet sein, dass die transferierten Zellen eine starke homöostatische Proliferation aufweisen, die es ihnen ermöglicht die T-Zellnische in der RAG1-defizienten Maus relativ schnell aufzufüllen. Interessanterweise wiesen die transferierten Wildtyp CD8⁺ T-Zellen z.T. auch eine höhere Apoptoserate als die CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen auf. Die Ursache ist unklar, die gesteigerte Apoptose könnte aber eine direkte Folge der stärkeren Proliferation sein. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Proliferation von CXCR6-defizienten Zellen könnte eine gesteigerte *Exhaustion* sein. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen aber gegen diese Hypothese. Obwohl die Expression von PD-1 auf CXCR6-defizienten Zellen verglichen mit den Wildtyp Zellen leicht erhöht war, zeigten die Wildtyp Zellen eine gesteigerte Expression von LAG3 und CD244. Die Analyse der Produktion von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den CXCR6-defizienten und Wildtyp Zellen. Auch der Aktivierungszustand (Expressionsprofil von CD44 und CD62L) war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte unterschiedlich. Generell ist der *Exhaustion*-Status auch untypisch für das akute Infektionsmodell der Listerieninfektion. Normalerweise entwickeln CD8⁺ T-Zellen diesen Status während chronischer Infektionen, in der Maus zum Beispiel durch bestimmte LCMV-Stämme [19].

In Zellkulturansätzen sollten im letzten Abschnitt die Mechanismen des Proliferationsdefekts der CXCR6-defizienten Zellen aufgeklärt werden. Wildtyp und CXCR6-defiziente Zellen wurden dazu *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen von CXCL16 und IL-15 inkubiert. IL-15 kontrolliert die Proliferation und das Überleben von Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen [71] und diente als direkter Vergleich für potentiell ähnliche Eigenschaften von CXCL16.

In der Kokultur war der Anteil an Wildtyp CD8⁺ T-Zellen verglichen mit dem Anteil an CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen größer. Die Zugabe von CXCL16 hatte keine Auswirkungen auf dieses Verhältnis und führte in keiner der beiden CD8⁺ T-Zellpopulationen zu einer Proliferation. Da in der Zellkultur auch Zellen vorliegen, die CXCL16 produzieren können, wie zum Beispiel Makrophagen [98], kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch ohne Zugabe von CXCL16 bereits wirksame Mengen des Chemokins im Ansatz vorliegen. Insgesamt könnte man

dieses Ergebnis so interpretieren, dass das Fehlen von CXCR6 ein vermindertes Überleben der Zellen zur Folge hat. CXCL16 wäre daher kein Proliferations- sondern ein Überlebensfaktor. Auch für CD1d-reaktive NKT-Zellen wurde bereits ein gesteigertes Überleben durch die CXCR6/CXCL16 Interaktion beschrieben [89] und die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CX₃CR1 können ein Überleben von Zellen ebenfalls vermitteln [108, 109]. Der Mechanismus der Induktion eines Überlebenssignals durch die Aktivierung von CXCR6 ist unbekannt und bedarf weiterer Studien. Nach Ligandenbindung an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CX₃CR1 wurde die Aktivierung von Akt beobachtet, was dann zu einem gesteigerten Überleben von Zellen führte [108, 109]. Da CXCR6 ebenfalls Akt aktivieren kann [110] wäre ein ähnlicher Mechanismus auch in NKT-Zellen und CD8⁺ T-Zellen möglich.

Nach einer Zugabe von sehr niedrigen Mengen von IL-15, die noch zu keiner Proliferation der Zellen führten, verringerte sich der Anteil an CXCR6-defizienten CD8⁺ T-Zellen noch weiter. Scheinbar führte das Fehlen von CXCR6 zu einer verminderten Sensitivität gegenüber diesem Zytokin. Die Ursache ist aber vollkommen unklar. Bei IL-15 Konzentrationen, die eine Proliferation induzierten, verminderte sich hingegen der Nachteil der CXCR6-defizienten Zellen. Auch bei einer Stimulation mit α CD3 und α CD28 näherte sich das Verhältnis der beiden Zellpopulationen wieder an. Dies bedeutet, dass in beiden Zellpopulationen eine Proliferation induziert wurde, die den Überlebensnachteil zumindest teilweise ausglich.

Insgesamt zeigten die Daten, dass CXCR6-defiziente CD8⁺ T-Zellen sowohl *in vivo* nach kompetitiven T-Zelltransfers als auch *in vitro* verglichen mit den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen weniger stark proliferierten. Die Ergebnisse der Zellkulturansätze deuteten zusätzlich darauf hin, dass die Interaktion zwischen dem Chemokinrezeptor CXCR6 und seinem Liganden CXCL16 wichtig für das Überleben von CD8⁺ T-Zellen war.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Lebenszyklus des Bakteriums <i>Listeria monocytogenes</i>	2
1.2	Präsentation von Listerien-spezifischen Peptiden	4
1.3	Biologische Funktionen von Chemokinen und Chemokinrezeptoren	8
1.4	Einwanderung von Leukozyten in die Leber	10
1.5	Schematische Darstellung des Chemokinrezeptors CXCR1	11
4.1	Identifizierung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach Transfer in Thy1.1-Mäuse	23
4.2	FACS <i>Gating</i> -Strategie: Identifizierung von singulären, lebenden Lymphozyten	32
5.1	Expression von CXCR6 auf CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>Lm</i> OVA Infektion	35
5.2	Expression von CXCR6 auf aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>Lm</i> OVA Infektion	37
5.3	Expression von CXCR6 auf Listerien-spezifischen IFN- γ produzierenden CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>Lm</i> OVA Infektion	39
5.4	Listerienbelastung in Milz und Leber von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} Mäusen	40
5.5	Primäre T-Zellantwort in der Milz	42
5.6	Primäre T-Zellantwort in der Leber	44
5.7	Sekundäre T-Zellantwort in der Milz	45
5.8	Sekundäre T-Zellantwort in der Leber	47
5.9	Verteilung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in Wildtyp Mäuse	49
5.10	Aktivierungsstatus von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in Wildtyp Mäuse	50
5.11	KLRG1-Expression von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in Wildtyp Mäuse	52
5.12	Verteilung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	53
5.13	Annexin V-Bindung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	55
5.14	FLICA-Färbung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	56

5.15	Ki-67-Expression von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	57
5.16	BrdU-Einlagerung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	58
5.17	Erschöpfung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	60
5.18	Zytokin-Produktion von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	61
5.19	Aktivierungsstatus von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} OT-I CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz nach kompetitivem Transfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	63
5.20	Verhältnis von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit CXCL16	65
5.21	Proliferation und Blastenbildung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit CXCL16	66
5.22	Verhältnis von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit IL-15	67
5.23	Proliferation und Blastenbildung von Wildtyp und CXCR6 ^{GFP/GFP} CD8 ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit IL-15	68

Literaturverzeichnis

- [1] LOW, J. und DONACHIE, W. *A review of Listeria monocytogenes and listeriosis*. The Veterinary Journal 153:9–29, **1997**
- [2] PAMER, E.G. *Immune responses to Listeria monocytogenes*. Nature Reviews Immunology 4(10):812–823, **2004**
- [3] LAMONT, R. und SOBEL, J. *Listeriosis in human pregnancy: a systematic review*. Journal of Perinatal Medicine 39(3):227–236, **2011**
- [4] LAMBRECHTS, A., GEVAERT, K., COSSART, P., VANDEKERCKHOVE, J. und VAN TROYS, M. *Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work*. Trends in Cell Biology 18(5):220–227, **2008**
- [5] WONG, P. und PAMER, E.G. *CD8 T cell responses to infectious pathogens*. Annual Review of Immunology 21(2):29–70, **2003**
- [6] HAMON, M., BIERNE, H. und COSSART, P. *Listeria monocytogenes: a multifaceted model*. Nature Reviews Microbiology 4(6):423–434, **2006**
- [7] MURPHY, K., TRAVERS, P. und WALPORT, M. *Janeways Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 7. Auflage, **2008**
- [8] KAECH, S.M. und CUI, W. *Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation*. Nature Reviews Immunology 12(11):749–761, **2012**
- [9] WILLIAMS, M.A. und BEVAN, M.J. *Effector and memory CTL differentiation*. Annual Review of Immunology 25:171–192, **2007**
- [10] OBAR, J.J., JELLISON, E.R., SHERIDAN, B.S., BLAIR, D.A., PHAM, Q.M., ZICKOVICH, J.M. und LEFRANÇOIS, L. *Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation*. Journal of Immunology 187(10):4967–4978, **2011**
- [11] WIESEL, M., CROUSE, J., BEDENIKOVIC, G., SUTHERLAND, A., JOLLER, N. und OXENIUS, A. *Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8+ T cells in vivo*. European Journal of Immunology 42(2):320–329, **2012**

- [12] VOEHRINGER, D., BLASER, C., BRAWAND, P., RAULET, D.H., HANKE, T. und PIRCHER, H. *Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells*. *Journal of Immunology* 167(9):4838–4843, **2001**
- [13] KAECH, S.M., TAN, J.T., WHERRY, E.J., KONIECZNY, B.T., SURH, C.D. und AHMED, R. *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. *Nature immunology* 4(12):1191–1198, **2003**
- [14] JOSHI, N.S., CUI, W., CHANDELE, A., LEE, H.K., URSO, D.R., HAGMAN, J., GAPIN, L. und KAECH, S.M. *Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor*. *Immunity* 27(2):281–295, **2007**
- [15] SURH, C.D. und SPRENT, J. *Homeostasis of naive and memory T cells*. *Immunity* 29(6):848–862, **2008**
- [16] SALLUSTO, F., LENIG, D., FO, R., LIPP, M. und LANZAVECCHIA, A. *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials*. *Nature* 401:708–712, **1999**
- [17] JAMESON, S.C. und MASOPUST, D. *Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches*. *Immunity* 31(6):859–871, **2009**
- [18] ZAJAC, A.J., BLATTMAN, J.N., MURALI-KRISHNA, K., SOURDIVE, D.J., SURESH, M., ALTMAN, J.D. und AHMED, R. *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. *Journal of Experimental Medicine* 188(12):2205–2213, **1998**
- [19] WHERRY, E.J. *T cell exhaustion*. *Nature Immunology* 12(6):492–499, **2011**
- [20] KIM, C.H. und BROXMEYER, H.E. *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function*. *Journal of Leukocyte Biology* 65(1):6–15, **1999**
- [21] ROSSI, D. und ZLOTNIK, A. *The biology of chemokines and their receptors*. *Annual Review of Immunology* 18(6):217–242, **2000**
- [22] OO, Y.H., SHETTY, S. und ADAMS, D.H. *The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver*. *Digestive Diseases* 28(1):31–44, **2010**
- [23] MURPHY, P.M., BAGGIOLINI, M., CHARO, I.F., HÉBERT, C.A., HORUK, R., MATSUSHIMA, K., MILLER, L.H., OPPENHEIM, J.J. und POWER, C.A. *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. *Pharmacological Reviews* 52(1):145–176, **2000**
- [24] ROLLINS, B.J. *Chemokines*. *Blood* 90(3):909–928, **1997**
- [25] ZLOTNIK, A. und YOSHIE, O. *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity* 12(2):121–127, **2000**

- [26] HASE, K., MURAKAMI, T., TAKATSU, H., SHIMAOKA, T., IIMURA, M., HAMURA, K., KAWANO, K., OHSHIMA, S., CHIHARA, R., ITOH, K., YONEHARA, S. und OHNO, H. *The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT*. *Journal of Immunology* 176(1):43–51, **2006**
- [27] CAMPBELL, J.J. und BUTCHER, E.C. *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing*. *Current Opinion in Immunology* 12(3):336–341, **2000**
- [28] MURDOCH, C. und FINN, A. *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. *Blood* 95(10):3032–3043, **2000**
- [29] SEGERER, S., NELSON, P.J. und SCHLÖNDORFF, D. *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. *Journal of the American Society of Nephrology* 11(1):152–176, **2000**
- [30] MEISER, A., MUELLER, A., WISE, E.L., MCDONAGH, E.M., PETIT, S.J., SARAN, N., CLARK, P.C., WILLIAMS, T.J. und PEASE, J.E. *The Chemokine Receptor CXCR3 Is Degraded following Internalization and Is Replenished at the Cell Surface by De Novo Synthesis of Receptor*. *Journal of Immunology* 180:6713–6724, **2008**
- [31] VIOLA, A. und LUSTER, A.D. *Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48:171–197, **2008**
- [32] DENG, H., UNUTMAZ, D., KEWALRAMANI, V.N. und LITTMAN, D.R. *Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses*. *Nature* 388:296–300, **1997**
- [33] LIAO, F., ALKHATIB, G., PEDEN, K.W.C., SHARMA, G., BERGER, E.A. und FARBER, J.M. *STRL33, A Novel Chemokine Receptor-like Protein Functions as a Fusion Cofactor for Both Macrophage-tropic and T Cell Line-tropic HIV-1*. *Journal of Experimental Medicine* 185(11):2015–2023, **1997**
- [34] DENG, L., CHEN, N., LI, Y., ZHENG, H. und LEI, Q. *CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1806(1):42–49, **2010**
- [35] LA PORTA, C.A.M. *CXCR6: the role of environment in tumor progression. Challenges for therapy*. *Stem cell Rev and Rep* 8(4):1282–1285, **2012**
- [36] SHEIKINE, Y. und SIRSJÖ, A. *CXCL16/SR-PSOX—a friend or a foe in atherosclerosis?* *Atherosclerosis* 197(2):487–495, **2008**
- [37] EVGUENI, A., WANKIEWICZ, E., SCOTT, C., CANTY, A., DANSKA, J.S., IVAKINE, E.A., GULBAN, O.M., MORTIN-TOTH, S.M., WANKIEWICZ, E., SCOTT, C., SPURRELL, D.,

- CANTY, A. und DANSKA, J.S. *Molecular Genetic Analysis of the Idd4 Locus Implicates the IFN Response in Type 1 Diabetes Susceptibility in Nonobese Diabetic Mice*. *Journal of Immunology* 176:2976–2990, **2006**
- [38] ASLANIAN, A.M. und CHARO, I.F. *Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis*. *Circulation* 114(6):583–590, **2006**
- [39] GALKINA, E., HARRY, B.L., LUDWIG, A., LIEHN, E.A., SANDERS, J.M., BRUCE, A., WEBER, C. und LEY, K. *CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing, interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall*. *Circulation* 116(16):1801–1811, **2007**
- [40] LATTA, M., MOHAN, K. und ISSEKUTZ, T.B. *CXCR6 is expressed on T cells in both T helper type 1 (Th1) inflammation and allergen-induced Th2 lung inflammation but is only a weak mediator of chemotaxis*. *Immunology* 121(4):555–564, **2007**
- [41] BOUAZZAOU, A., SPACENKO, E., MUELLER, G., MIKLOS, S., HUBER, E., HOLLER, E., ANDREESEN, R. und HILDEBRANDT, G. *Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease*. *Genes and immunity* 10(3):687–701, **2009**
- [42] JIANG, X., SHIMAOKA, T., KOJO, S., HARADA, M., WATARAI, H., WAKAO, H., OHKOHCHI, N., YONEHARA, S., TANIGUCHI, M. und SEINO, K.I. *Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance*. *Journal of immunology* 175(4):2051–2055, **2005**
- [43] KIM, J.V., JIANG, N., TADOKORO, C.E., LIU, L., RANSOHOFF, R.M., LAFAILLE, J.J. und DUSTIN, M.L. *Two-photon laser scanning microscopy imaging of intact spinal cord and cerebral cortex reveals requirement for CXCR6 and neuroinflammation in immune cell infiltration of cortical injury sites*. *Journal of Immunological Methods* 352:89–100, **2010**
- [44] CALABRESI, P.A., YUN, S.H., ALLIE, R. und WHARTENBY, K.A. *Chemokine receptor expression on MBP-reactive T cells: CXCR6 is a marker of IFN γ -producing effector cells*. *Journal of Neuroimmunology* 127(1-2):96–105, **2002**
- [45] TERAMOTO, K., NEGORO, N., KITAMOTO, K., IWAI, T., IWAO, H., OKAMURA, M. und MIURA, K. *Microarray Analysis of Glomerular Gene Expression in Murine Lupus Nephritis*. *Journal of Pharmacological Sciences* 106(1):56–67, **2008**
- [46] GARCIA, G.E., TRUONG, L.D., LI, P., ZHANG, P., JOHNSON, R.J., WILSON, C.B. und FENG, L. *Inhibition of CXCL16 attenuates inflammatory and progressive phases of anti-glomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephritis*. *The American journal of pathology* 170(5):1485–1496, **2007**

- [47] RUTH, J.H., HAAS, C.S., PARK, C.C., AMIN, M.A., MARTINEZ, R.J., KENNETH HAINES III, G., SHAHRARA, S., CAMPBELL, P.L. und KOCH, A.E. *CXCL16-Mediated Cell Recruitment to Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue and Murine Lymph Nodes Is Dependent Upon the MAPK Pathway*. *Arthritis Rheum* 54(3):765–778, **2006**
- [48] HEDMAN, M., FARESJÖ, M., AXELSSON, S., LUDVIGSSON, J. und CASAS, R. *Impaired CD4 and CD8 T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children*. *Clinical and experimental immunology* 153(3):360–368, **2008**
- [49] SORDI, V., MALOSIO, M.L., MARCHESI, F., MERCALLI, A., MELZI, R., GIORDANO, T., BELMONTE, N., FERRARI, G., LEONE, B.E., BERTUZZI, F., ZERBINI, G., ALLAVENA, P., BONIFACIO, E. und PIEMONTE, L. *Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets*. *Blood* 106(2):419–427, **2005**
- [50] DIEGELMANN, J., PH, D., SEIDERER, J., NIESS, J.H., HALLER, D., PH, D., GÖKE, B., REINECKER, H.C. und BRAND, S. *Expression and regulation of the chemokine CXCL16 in Crohn's disease and models of intestinal inflammation*. *Inflammatory Bowel Diseases* 16(11):1871–1881, **2010**
- [51] WANG, J., LU, Y., WANG, J., KOCH, A.E., ZHANG, J. und RUSSELL, S. *CXCR6 Induces Prostate Cancer Progression by the AKT/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway*. *Cancer research* 68(24):10367–10376, **2008**
- [52] MEIJER, J., OGINK, J., KREIKE, B., NUYTEN, D., DE VISSER, K.E. und ROOS, E. *The chemokine receptor CXCR6 and its ligand CXCL16 are expressed in carcinomas and inhibit proliferation*. *Cancer research* 68(12):4701–4708, **2008**
- [53] MATSUMURA, S., WANG, B., KAWASHIMA, N., BRAUNSTEIN, S., BADURA, M., CAMERON, T.O., BABB, J.S. und SCHNEIDER, R.J. *Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells*. *Journal of immunology* 181(5):3099–3107, **2008**
- [54] GUTWEIN, P., SCHRAMME, A., SINKE, N., ABDEL-BAKKY, M.S., VOSS, B., OBERMÜLLER, N., DOBERSTEIN, K., KOZIOLEK, M., FRITZSCHE, F., JOHANNSEN, M., JUNG, K., SCHAIDER, H., ALTEVOGT, P., LUDWIG, A., PFEILSCHIFTER, J. und KRISTIANSEN, G. *Tumoural CXCL16 expression is a novel prognostic marker of longer survival times in renal cell cancer patients*. *European journal of cancer* 45(3):478–489, **2009**
- [55] SEIDL, H., RICHTIG, E., TILZ, H., STEFAN, M., SCHMIDBAUER, U., ASSLABER, M., ZATLOUKAL, K., HERLYN, M. und SCHAIDER, H. *Profiles of chemokine receptors in melanocytic lesions: de novo expression of CXCR6 in melanoma*. *Human pathology* 38(5):768–780, **2007**

- [56] BLAAK, H., BOERS, P.H.M., GRUTERS, R.A., SCHUITEMAKER, H., ENDE, M.E.V.D. und OSTERHAUS, A.D.M.E. *CCR5, GPR15, and CXCR6 Are Major Coreceptors of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Variants Isolated from Individuals with and without Plasma Viremia*. *Journal of virology* 79(3):1686–1700, **2005**
- [57] DUGGAL, P., AN, P., BEATY, T.H., STRATHDEE, S.A., FARZADEGAN, H., MARKHAM, R.B., JOHNSON, L., O'BRIEN, S.J., VLAHOV, D. und WINKLER, C.A. *Genetic influence of CXCR6 chemokine receptor alleles on PCP-mediated AIDS progression among African Americans*. *Genes and immunity* 4(4):245–250, **2003**
- [58] LIMOU, S., COULONGES, C., HERBECK, J.T., VAN MANEN, D., AN, P., LE CLERC, S., DELANEAU, O., DIOP, G., TAING, L., MONTES, M., VAN'T WOUT, A.B., GOTTLIEB, G.S., THERWATH, A., ROUZIYOUX, C., DELFRAISSY, J.F., LELIÈVRE, J.D., LÉVY, Y., HERCBERG, S., DINA, C., PHAIR, J., DONFIELD, S., GOEDERT, J.J., BUCHBINDER, S., ESTAQUIER, J., SCHÄCHTER, F., GUT, I., FROGUEL, P., MULLINS, J.I., SCHUITEMAKER, H., WINKLER, C. und ZAGURY, J.F. *Multiple-cohort genetic association study reveals CXCR6 as a new chemokine receptor involved in long-term nonprogression to AIDS*. *The Journal of infectious diseases* 202(6):908–915, **2010**
- [59] HEYDTMANN, M., LALOR, P.F., EKSTEEN, J.A., HÜBSCHER, S.G., BRISKIN, M., ADAMS, D.H., HEYDTMANN, M., LALOR, P.F., EKSTEEN, J.A., HU, S.G., BRISKIN, M. und ADAMS, D.H. *CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver*. *Journal of Immunology* 174:1055–1062, **2005**
- [60] SATO, T., THORLACIUS, H., JOHNSTON, B., TRACY, L., XIANG, W., LITTMAN, D.R., EUGENE, C., STATON, T.L. und BUTCHER, E.C. *Role for CXCR6 in Recruitment of Activated CD8+ Lymphocytes to Inflamed Liver*. *Journal of Immunology* 174:277–283, **2005**
- [61] OH, S.T., SCHRAMME, A., TILGEN, W., GUTWEIN, P. und REICHRATH, J. *Overexpression of CXCL16 in lesional psoriatic skin*. *Dermato-endocrinology* 1(2):114–118, **2009**
- [62] MARTINI, G., CABRELLE, A., CALABRESE, F., CARRARO, S., SCQUIZZATO, E., TERAMO, A., FACCO, M., ZULIAN, F. und AGOSTINI, C. *CXCR6-CXCL16 interaction in the pathogenesis of Juvenile Idiopathic Arthritis*. *Clinical immunology* 129(2):268–276, **2008**
- [63] VAN DER VOORT, R., VAN LIESHOUT, A.W.T., TOONEN, L.W.J., SLÖETJES, A.W., VAN DEN BERG, W.B., FIGDOR, C.G., RADSTAKE, T.R.D.J. und ADEMA, G.J. *Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints*. *Arthritis and rheumatism* 52(5):1381–91, **2005**

- [64] NANKI, T., SHIMAOKA, T., HAYASHIDA, K., TANIGUCHI, K., YONEHARA, S. und MIYASAKA, N. *Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis*. *Arthritis and rheumatism* 52(10):3004–3014, **2005**
- [65] UNUTMAZ, D., XIANG, W., SUNSHINE, M.J., CAMPBELL, J., BUTCHER, E. und LITTMAN, D.R. *The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse*. *Journal of immunology* 165(6):3284–3292, **2000**
- [66] HOGQUIST, K., JAMESON, S. und HEATH, W. *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. *Cell* 76:17–27, **1994**
- [67] FOULDS, K.E., ZENEWICZ, L.A., SHEDLOCK, D.J., JIANG, J., TROY, A.E. und SHEN, H. *Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses*. *Journal of Immunology* 168(4):1528–1532, **2002**
- [68] KURSAR, M., HÖPKEN, U.E., KOCH, M., KÖHLER, A., LIPP, M., KAUFMANN, S.H.E. und MITTRÜCKER, H.W. *Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during Listeria monocytogenes infection*. *Journal of Experimental Medicine* 201(9):1447–1457, **2005**
- [69] KURSAR, M., BONHAGEN, K., KÖHLER, A., KAMRADT, T., KAUFMANN, S.H.E. und MITTRÜCKER, H.W. *Organ-specific CD4+ T cell response during Listeria monocytogenes infection*. *Journal of Immunology* 168(12):6382–6387, **2002**
- [70] KURSAR, M., BONHAGEN, K., KÖHLER, A., KAMRADT, T., KAUFMANN, S.H. und MITTRÜCKER, H.W. *Antigen-specific CD8+ T cell responses in intestinal tissues during murine listeriosis*. *Microbes and Infection* 6(1):8–16, **2004**
- [71] JUDGE, A.D., ZHANG, X., FUJII, H., SURH, C.D. und SPRENT, J. *Interleukin 15 Controls both Proliferation and Survival of a Subset of Memory-Phenotype CD8+ T Cells*. *Journal of Experimental Medicine* 196(7):935–946, **2002**
- [72] SWIECKI, M., GILFILLAN, S., VERMI, W., WANG, Y. und COLONNA, M. *Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual*. *Immunity* 33(6):955–966, **2010**
- [73] SCHOLZEN, T. und GERDES, J. *The Ki-67 Protein : From the Known and the Unknown*. *Journal of Cellular Physiology* 182:311–322, **2000**
- [74] SCHITTEK, B., RAJEWSKY, K. und FÖRSTER, I. *Dividing cells in bone marrow and spleen incorporate bromodeoxyuridine with high efficiency*. *European Journal of Immunology* 21(1):235–238, **1991**

- [75] GRATZNER, H.G. und LEIF, R.C. *An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry*. *Cytometry* 1(6):385–393, **1981**
- [76] VAN ENGELAND, M., NIELAND, L.J., RAMAEKERS, F.C., SCHUTTE, B. und REUTELINGSPERGER, C.P. *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. *Cytometry* 31(1):1–9, **1998**
- [77] SMOLEWSKI, P., GRABAREK, J., HALICKA, H.D. und DARZYNKIEWICZ, Z. *Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis*. *Journal of Immunological Methods* 265(1-2):111–121, **2002**
- [78] GOODISON, S., URQUIDI, V. und TARIN, D. *CD44 cell adhesion molecules*. *Journal of Clinical Pathology: Molecular pathology* 52(4):189–196, **1999**
- [79] KAUFMANN, S.H. *Immunity to Intracellular Bacteria*. *Annual Review of Immunology* 11:129–163, **1993**
- [80] KURSAR, M., JÄNNER, N., PFEFFER, K., BRINKMANN, V., KAUFMANN, S.H.E. und MITTRÜCKER, H.W. *Requirement of secondary lymphoid tissues for the induction of primary and secondary T cell responses against *Listeria monocytogenes**. *European Journal of Immunology* 38:127–138, **2008**
- [81] KLONOWSKI, K.D., WILLIAMS, K.J., MARZO, A.L., BLAIR, D.A., LINGENHELD, E.G. und LEFRANC, L. *Dynamics of Blood-Borne CD8 Memory T Cell Migration In Vivo*. *Immunity* 20:551–562, **2004**
- [82] COSE, S., BRAMMER, C., KHANNA, K.M., MASOPUST, D. und LEFRANCOIS, L. *Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway*. *European Journal of Immunology* 36:1423–1433, **2006**
- [83] BONDER, C.S., NORMAN, M.U., SWAIN, M.G., ZBYTNUIK, L.D., YAMANOUCHI, J., SANTAMARIA, P., AJUEBOR, M., SALMI, M., JALKANEN, S. und KUBES, P. *Rules of Recruitment for Th1 and Th2 Lymphocytes in Inflamed Liver : A Role for Alpha-4 Integrin and Vascular Adhesion Protein-1*. *Immunity* 23:153–163, **2005**
- [84] VOLPES, R., JOOST, J.V.D.O. und DESMET, V.J. *Hepatic Expression of Intercellular Adhesion Molecule- 1 (ICAM-1) in Viral Hepatitis B*. *Hepatology* 12(1):148–154, **1990**
- [85] BUBONJA, M., WRABER, B., BRUMINI, G., GOBIN, I., VELJKOVIC, D. und ABRAM, M. *Systemic and Local CC Chemokines Production in a Murine Model of *Listeria monocytogenes* Infection*. *Mediators of Inflammation* 2006:1–8, **2006**
- [86] ZHOU, Y., KURIHARA, T., RYSECK, R.P., YANG, Y., RYAN, C., LOY, J., WARR, G. und BRAVO, R. *Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in*

- mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor.* Journal of immunology 160(8):4018–4025, **1998**
- [87] ZHONG, M.X., KUZIEL, W.A., PAMER, E.G. und SERBINA, N.V. *Chemokine Receptor 5 Is Dispensable for Innate and Adaptive Immune Responses to Listeria monocytogenes Infection.* Infection and Immunity 72(2):1057–1064, **2004**
- [88] KURACHI, M., KURACHI, J., SUENAGA, F., TSUKUI, T., ABE, J., UEHA, S., TOMURA, M., SUGIHARA, K., TAKAMURA, S., KAKIMI, K. und MATSUSHIMA, K. *Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration.* Journal of experimental medicine 208(8):1605–1620, **2011**
- [89] GEISSMANN, F., CAMERON, T.O., SIDOBRE, S., MANLONGAT, N., KRONENBERG, M., BRISKIN, M.J., DUSTIN, M.L. und LITTMAN, D.R. *Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids.* PLoS biology 3(4):e113, **2005**
- [90] BUSCH, D.H., PILIP, I.M., VIJH, S. und PAMER, E.G. *Coordinate Regulation of Complex T Cell Populations Responding to Bacterial Infection.* Immunity 8:353–362, **1998**
- [91] ARRUNATEGUI-CORREA, V. und SIL KIM, H. *The role of CD1d in the immune response against Listeria infection.* Cellular Immunology 227(2):109–120, **2004**
- [92] SZALAY, G., LADEL, C.H., BLUM, C., BROSSAY, L., KRONENBERG, M. und KAUFMANN, S.H. *Cutting edge: anti-CD1 monoclonal antibody treatment reverses the production patterns of TGF-beta 2 and Th1 cytokines and ameliorates listeriosis in mice.* Journal of immunology 162(12):6955–6958, **1999**
- [93] BJORDAHL, R.L., GAPIN, L., MARRACK, P. und REFAELI, Y. *iNKT cells suppress the CD8+ T cell response to a murine Burkitt's-like B cell lymphoma.* PloS one 7(8):e42635, **2012**
- [94] MATTAROLLO, S.R., YONG, M., GOSMANN, C., CHOYCE, A., CHAN, D., LEGGATT, G.R. und FRAZER, I.H. *NKT cells inhibit antigen-specific effector CD8 T cell induction to skin viral proteins.* Journal of Immunology 187(4):1601–1608, **2011**
- [95] GOUBIER, A., VOCANSON, M., MACARI, C., POYET, G., HERBELIN, A., NICOLAS, J.F., DUBOIS, B. und KAISERLIAN, D. *Invariant NKT cells suppress CD8(+) T-cell-mediated allergic contact dermatitis independently of regulatory CD4(+) T cells.* Journal of investigative dermatology 133(4):980–987, **2013**
- [96] RIEDEL, J.H., PAUST, H.J., TURNER, J.E., TITTEL, A.P., KREBS, C., DISTELDORF, E., WEGSCHEID, C., TIEGS, G., VELDEN, J., MITTRÜCKER, H.W., GARBI, N., STAHL, R.A.K., STEINMETZ, O.M., KURTS, C. und PANZER, U. *Immature renal dendritic cells recruit regulatory CXCR6(+) invariant natural killer T cells to attenuate crescentic GN.* Journal of the American Society of Nephrology : JASN 23(12):1987–2000, **2012**

- [97] JIANG, X., SUN, W., ZHU, L., GUO, D., JIANG, H., MA, D., JIN, J., ZHAO, Y. und LIANG, J. *Expression of CXCR6 on CD8(+) T cells was up-regulated in allograft rejection*. *Transplant immunology* 22(3-4):179–183, **2010**
- [98] WILBANKS, A., ZONDLO, S.C., MURPHY, K., MAK, S., SOLER, D., LANGDON, P., ANDREW, D.P., WU, L. und BRISKIN, M. *Expression Cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR Ligand Reveals Elements of CC, CXC, and CX3C Chemokines*. *Journal of Immunology* 166:5145–5154, **2001**
- [99] MATLOUBIAN, M., DAVID, A., ENGEL, S., RYAN, J.E. und CYSTER, J.G. *A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo*. *Nature immunology* 1(4):298–304, **2000**
- [100] NAKAYAMA, T., HIESHIMA, K., IZAWA, D., TATSUMI, Y., KANAMARU, A. und YOSHIE, O. *Cutting Edge : Profile of Chemokine Receptor Expression on Human Plasma Cells Accounts for Their Efficient Recruitment to Target Tissues*. *Journal of Immunology* 170:1136–1140, **2003**
- [101] SHIMAOKA, T., NAKAYAMA, T., FUKUMOTO, N., KUME, N., TAKAHASHI, S., YAMAGUCHI, J., MINAMI, M., HAYASHIDA, K., KITA, T. und OHSUMI, J. *Cell surface-anchored SR-PSOX / CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells*. *Journal of Leukocyte Biology* 75:267–274, **2004**
- [102] BOISVERT, J., KUNKEL, E.J., CAMPBELL, J.J., KEEFFE, E.B., BUTCHER, E.C. und GREENBERG, H.B. *Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes*. *Journal of hepatology* 38(1):67–75, **2003**
- [103] SHIELDS, P.L., MORLAND, C.M., SALMON, M., QIN, S., HUBSCHER, S.G. und ADAMS, D.H. *Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver*. *Journal of Immunology* 163:6236–6243, **1999**
- [104] KIM, C.H., ROTT, L., KUNKEL, E.J., GENOVESE, M.C., ANDREW, D.P., WU, L. und BUTCHER, E.C. *Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo*. *Journal of Clinical Investigation* 108(9):1331–1339, **2001**
- [105] HOLST, P.J., ORSKOV, C., QVORTRUP, K., CHRISTENSEN, J.P. und THOMSEN, A.R. *CCR5 and CXCR3 are dispensable for liver infiltration, but CCR5 protects against virus-induced T-cell-mediated hepatic steatosis*. *Journal of virology* 81(18):10101–10112, **2007**
- [106] SHI, C., VELÁZQUEZ, P., HOHL, T.M., LEINER, I., DUSTIN, M.L. und PAMER, E.G. *Monocyte trafficking to hepatic sites of bacterial infection is chemokine independent and directed by focal intercellular adhesion molecule-1 expression*. *Journal of Immunology* 184(11):6266–6274, **2010**

- [107] PAUST, S., GILL, H.S., WANG, B.Z., FLYNN, M.P., ASHLEY, E., SENMAN, B., SZCZEPANIK, M., TELENTI, A., PHILIP, W., COMPANS, R.W. und ANDRIAN, U.H.V. *Critical role for CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory to haptens and viruses*. *Nature Immunology* 11(12):1127–1135, **2010**
- [108] TILTON, B., HO, L., OBERLIN, E., LOETSCHER, P., BALEUX, F., CLARK-LEWIS, I. und THELEN, M. *Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes*. *Journal of experimental medicine* 192(3):313–324, **2000**
- [109] BOEHME, S.A., LIO, F.M., MACIEJEWSKI-LENOIR, D., BACON, K.B. und CONLON, P.J. *The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia*. *Journal of immunology* 165(1):397–403, **2000**
- [110] CHANDRASEKAR, B., BYSANI, S. und MUMMIDI, S. *CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation*. *Journal of biological chemistry* 279(5):3188–3196, **2004**