

Einfluss von CD152-Signalen auf das Migrationsverhalten von T_H1-Lymphozyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom Biologin Karin Knieke

geb. am 27.11.1963 in Bielefeld

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Monika C. Brunner-Weinzierl

Prof. med. habil. Dr. rer. nat. Barbara Seliger

eingereicht am: 14.07.2010

verteidigt am: 02.02.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen.....	3
1 Einleitung	6
1.1 <i>Das angeborene Immunsystem</i>	6
1.2 <i>Das adaptive Immunsystem</i>	6
1.2.1 <i>Humorale Immunität</i>	7
1.2.2 <i>Zellvermittelte Immunität</i>	7
1.3 <i>Kostimulatorische Signale bei der Aktivierung von T-Zellen</i>	9
1.3.1 <i>Das kostimulatorische Molekül CD152</i>	10
1.3.2 <i>Immunmodulatorische Mechanismen der CD152-Signale</i>	11
1.3.3 <i>Pathologie der CD152-Defizienz</i>	14
1.4 <i>Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen zu T_H1-, T_H2-, T_H17 oder regulatorischen T-Zellen</i>	15
1.5 <i>Rezirkulation von Lymphozyten: das Mehrschrittmodell</i>	17
1.5.1 <i>Adhäsion von T-Zellen: Integrine, Selektine und deren Liganden</i>	19
1.5.2 <i>Chemotaxis: Chemokine und Chemokinrezeptoren</i>	19
1.6 <i>Signalwege der Chemokin-vermittelten Migration</i>	22
1.6.1 <i>Desensibilisierung von Chemokinrezeptoren durch GRK2</i>	24
1.6.2 <i>PI3’K-induzierte Akt-Signale durch die Chemokin-Rezeptorbindung</i>	24
1.6.3 <i>Chemokinrezeptorsignale und Kostimulation</i>	26
1.7 <i>Zielsetzung</i>	28
2 Material und Methoden	29
2.1 <i>Medien und Puffer</i>	29
2.2 <i>Antikörper</i>	31
2.3 <i>Rekombinante Cytokine und Chemokine</i>	33
2.4 <i>Versuchstiere</i>	33
2.5 <i>Genetische Typisierung</i>	33
2.6 <i>Herstellung von Fab-Fragmenten</i>	34
2.7 <i>Isolation primärer Zellen</i>	35
2.8 <i>T-Zellaktivierung und Differenzierung zu T_H1-Zellen</i>	36
2.8.1 <i>Antigen-spezifische Aktivierung</i>	36
2.8.2 <i>Polyklonale Aktivierung</i>	36
2.8.3 <i>Stimulation durch Mikropartikel mit definierten CD152-Signalen</i>	36
2.8.4 <i>Differenzierung zu T_H1-Zellen</i>	37
2.9 <i>Durchflusszytometrie</i>	37
2.9.1 <i>Markierung von Oberflächenantigenen</i>	39
2.9.2 <i>PMA/Ionomycin-Stimulation und Markierung intrazellulärer Zytokine</i>	39
2.9.3 <i>Markierung phosphorylierter Kinasen (Erk und Akt)</i>	39
2.9.4 <i>Markierung zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Proliferation</i>	40
2.10 <i>Retrovirale Transduktion</i>	40
2.11 <i>Chemotaxisversuche</i>	41
2.12 <i>Generierung einer einlagigen Endothelzellschicht auf Transwellmembranen</i>	42

2.13 Untersuchung der Migration <i>in vivo</i>	43
2.13.1 Organspezifische Akkumulation von T_H1 -Zellen nach adoptivem Transfer	43
2.13.2 <i>In vivo</i> Migration im Entzündungsmodell	44
2.14 Gelelektrophorese und Westernblot	44
2.15 Grafische Darstellung und Statistik	45
3 Ergebnisse	46
3.1 CD152-Signale beeinflussen die Migration von $CD4^+$ T-Zellen <i>in vitro</i>	46
3.2 Die chemotaktische Migration von $CD4^+$ T_H1 -Zellen ist <i>in vitro</i> ohne CD152-Engagement reduziert	47
3.3 Definierte CD152-Signale erhöhen die gerichtete Migration von T_H1 -Zellen	50
3.4 Die CD152-vermittelte Chemotaxis von T_H1 -Zellen steigt mit der Aktivierungsstärke der Zellen	52
3.5 Die CD152-vermittelte Chemotaxis besteht über eine Endothelbarriere	54
3.6 Die CD152-vermittelte Migration ist unabhängig von IFN- γ	56
3.7 Antigenpräsentierende Zellen beeinflussen die CD152-gesteuerte Migrationskapazität	58
3.8 CD152-kompetente $CD4^+$ T-Zellen zeigen erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR5	60
3.9 CCL4-induzierte Rezeptorsignale in T_H1 -Zellen sind abhängig von G-Proteinen und werden über GRK2 moduliert	62
3.10 Akt vermittelt in CD152-kompetenten T_H1 -Zellen Signale der Chemokinrezeptoren	64
3.11 CD152-Signale steuern die Lokalisierung von $CD4^+$ T_H1 -Zellen <i>in vivo</i>	69
3.12 CD152-Signale steigern die Migrationsrate pro-inflammatorischer T_H1 -Zellen in entzündetes Gewebe	71
4 Diskussion	75
4.1 Die Bedeutung der kostimulatorischen Moleküle CD152 und CD28 bei der Migration von $CD4^+$ T_H1 -Zellen	75
4.2 Der Einfluss der CD152-Expression auf die Regulation der Migration	77
4.3 Die Relevanz von CD152-Signalen für die Adhäsion und die Chemotaxis von T-Zellen	78
4.4 Differentielle Regulation der Chemokinrezeptorexpression auf $CD4^+$ T-Zellen durch CD152-Signale	80
4.5 CD152-Signale regulieren die Migration über direkte Signale	82
4.6 Die Bedeutung von CD152-Signalen für die erhöhte Sensibilität von Chemokinrezeptoren	83
4.7 Die Wirkung des CD152-Engagements auf Chemokin-induzierte Signalwege	85
4.8 Relevanz der CD152-vermittelten Migration von T_H1 -Zellen <i>in vivo</i>	88
4.9 Ausblick auf die therapeutische Nutzbarkeit	90
5 Zusammenfassung	92
Summary	94
6 Literatur	95
Danksagung	112
Erklärung	113
Publikationsliste	114

Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod, englisch: <i>activation induced cell death</i>
Ak	Antikörper
Akt	auch PKB, Proteinkinase B
AP-2	Adapterprotein-2
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin, englisch: <i>bovine serum albumin</i>
Bp	Basenpaare, englisch: <i>base pair</i>
CCL, CXCL	Chemokinrezeptorligand
CCR, CXCR	Chemokinrezeptor
CD	englisch: <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA, englisch: <i>copy DNA</i> (in DNA umgeschriebene RNA)
ConA	Concanavalin A
CTLA-4	auch CD152, englisch: <i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DAG	Diazylglyzerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure, englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
DTH	T-Zell-Entzündungsmodell, englisch: <i>delayed type hypersensitivity</i>
DZ	dendritische Zelle
ERK	extrazellulär regulierte Kinase, englisch: <i>extracellular signal regulated kinase</i>
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung, englisch: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat

FCS	fötales Kälberserum, englisch: <i>fetal calf serum</i>
FOX	Transkriptionsfaktor, englisch: <i>forkhead box</i>
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor, englisch: <i>guanine-nucleotide-exchange factor</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor, englisch: <i>G-proteine coupled receptor</i>
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HEV	hohe endotheliale Venolen
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, englisch: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IFA	Inkomplettes Freund`s Adjuvanz
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ , rIFN- γ	Interferon- γ , rekombinantes Interferon- γ
IS	Immunologische Synapse
ITAM	englisch: <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
LFA-1	Adhäsionsmolekül, englisch: <i>leukocyte-function-associated antigen-1</i>
LK	Lymphknoten
kDa	Kilodalton
MACS	magnetische Zellsortierung, englisch: <i>magnetic cell sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, englisch: <i>major histocompatibility complex</i>
Min.	Minute
mIEND	Endothelzelllinie, englisch: <i>murine mesenterial lymph node derived endothelial cell line</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mM, μ M	millimolar, micromolar
MS	Multiple Sklerose
NF-AT	englisch: <i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	englisch: <i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>

OVA	Ovalbumin
PBS	englisch: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion, englisch: <i>polymerase chain reaction</i>
PI3'K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PP2A	Serin/Threonin Phosphatase 2A
PTX	Pertussistoxin
RA	Rheumatoide Arthritis
Rap1	GTPase, englisch: <i>Ras-proximate 1</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan, lat.: sub cutis
Ser	Serin
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
T _{CM}	zentrale Gedächtnis-T-Zellen, englisch: <i>central memory T cells</i>
T _H	T-Helfer-Zelle
Thr	Threonin
T _{EM}	Effektor-Gedächtniszellen, englisch: <i>effector memory T cells</i>
T _{EFF}	Effektor-T-Zellen
tg	transgen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TGF-β	englisch: <i>transforming growth factor-β</i>
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
TZR	T-Zell Rezeptor
YVKM	Aminosäuren-Einbuchstabencode: Tyrosin, Valin, Lysin, Methionin

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Der Organismus von Tieren und Menschen muss sich fortlaufend gegen verschiedenste Krankheitserreger schützen und auch auf entartete Zellen reagieren können. Dafür benötigt er funktionierende Abwehrmechanismen. Zusätzlich zu physikalischen und chemischen Barrieren durch Epithelien und durch die von ihnen gebildete antimikrobielle Substanzen, findet die erste Verteidigung des Körpers gegen Pathogene durch die angeborene, unspezifische Abwehr statt. Sie umfasst bakterizide Proteine (u. a. Lysozym, Interferone, Komplement-Proteine) und phagozytierende Zellen wie z. B. Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen, die Infektionen durch die Aufnahme des Erregers unabhängig vom Pathogen bekämpfen können. Das angeborene Immunsystem reagiert schnell und immer gleich auf wiederholte Infektionen.

1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Verlauf der Evolution bildete sich ein weiteres, hochentwickeltes Abwehrsystem aus, das adaptive Immunsystem. Ausführende Zellen sind die Lymphozyten, die mit spezifischen Rezeptoren auf molekulare Strukturen verschiedener Erreger reagieren. Die zwei Hauptklassen der Lymphozyten sind B-Zellen und T-Zellen. B-Zellen wirken zentral bei der humoralen Immunität über lösliche, spezifische Abwehrproteine (Antikörper) in Blut und Lymphflüssigkeit. T-Zellen zeigen vor allem zellvermittelte Immunreaktionen, u. a. durch die direkte Wirkung von zytotoxischen Lymphozyten [1]. Das adaptive Immunsystem ist durch die vier Grundmerkmale, Spezifität, Gedächtnis, Vielfalt und Selbst-Fremd-Erkennung, charakterisiert. Es reagiert spezifisch auf die Art der Krankheitserreger, entwickelt sich in der Folge einer Infektion und ist anpassungsfähig. Immunantworten sind spezifisch für verschiedene Antigene, d.h. für strukturelle Komponenten eines einzigen komplexen Proteins, Polysaccharids oder Makromoleküls. Die Vielfalt beruht auf der Variabilität der Antigen-bindenden Strukturen der Rezeptoren und begründet das Lymphozytenrepertoire, die Gesamtzahl der antigenen Spezifitäten eines Individuums [1]. Bei der klonalen Selektion werden die Lymphozyten aktiviert, die den spezifischen Rezeptor zur Erkennung des Antigens besitzen. Diese Zellen proliferieren zu Effektorzellen mit identischen Rezeptoren. Einige antigenstimulierte Lymphozyten differenzieren zu ruhenden, langlebigen Gedächtniszellen. Bei erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen sind die Immunantworten schneller, stärker und beseitigen Erreger effektiver [1].

Immunzellen können zwischen eigenen und fremden Molekülen unterscheiden. Ist diese Erkennung gestört, kann der Angriff der Immunzellen auf körpereigenes Gewebe zu Autoimmunerkrankungen führen [2,3]. Die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen beruht auf mehreren Mechanismen wie Eliminierung der Lymphozyten, die Rezeptoren für Selbstantigene auf der Oberfläche tragen, oder funktionelle Inaktivierung selbstreaktiver Lymphozyten [2,3].

1.2.1 Humorale Immunität

B-Zellen bilden die wichtigste Komponente der humoralen Immunität, die der Verteidigung gegen extrazelluläre Erreger und deren Toxine dient. Sie entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark und wandern über das Blut in die Milz zur Reifung [1]. Antigen-Rezeptoren auf der Plasmamembran von B-Zellen sind membrangebundene Antikörper, die Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Lipide und kleine chemische Substanzen hochspezifisch erkennen können. Während die Produktion von niedrigaffinen Antikörpern gegen Polysaccharide und Lipide unabhängig von T-Zellen ist, benötigen B-Zellen für die Bildung von hochaffinen Antikörpern gegen Proteinantigene die Hilfe von T-Lymphozyten. Diese stimulieren die Proliferation der B-Zellen und fördern deren Differenzierung zu Effektorzellen, sogenannten Plasmazellen, die Antikörper sezernieren. Über somatische Rekombination verschiedener Antikörperketten werden ca. 10^{14} verschiedene Antigen-bindende Antikörper erreicht, durch somatische Hypermutationen im Bereich der variablen Regionen, die dem Antikörper zur Antigenerkennung dienen, reifen die Antikörper in ihrer Affinität [1,4]. Antikörper werden in fünf große Isotypklassen, Immunglobulin (Ig) M, IgD, IgG, IgA und IgE, mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt. So aktivieren IgM Antikörper hauptsächlich das Komplementsystem, wodurch Pathogene direkt lysiert oder durch Opsonisierung für Phagozyten zugänglich gemacht werden. IgE-Antikörper lösen bei Mastzellen die Freisetzung von inflammatorischem Histamin aus. Für die zellvermittelte Immunität sind B-Zellen relevant, weil sie Oberflächenmoleküle exprimieren, die der Antigenpräsentation und Kostimulation dienen und damit zur Aktivierung von T-Zellen führen (s. Kapitel 1.3) [1].

1.2.2 Zellvermittelte Immunität

Die zellvermittelte Immunität, bei der intrazelluläre Erreger bekämpft werden, wird hauptsächlich durch T-Lymphozyten vermittelt. Viren und einige Bakterien, z. B. Mycobakterien, Listerien und Legionellen, können innerhalb von infizierten Zellen überleben und sich vermehren. Sie sind dort unerreichbar für die Entdeckung und Eliminierung durch Antikörper. $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (T_H) aktivieren durch ihre Zytokinproduktion Phagozyten und zytotoxische

CD8⁺ T-Lymphozyten, die infizierte Zellen, die körperfremde Antigene produzieren, lysieren und dabei die Krankheitserreger vernichten.

T-Zellen entstammen hämatopoetischen Stammzellvorläufern, die in der fötalen Leber und im Knochenmark gebildet werden. Sie tragen T-Zell-Rezeptoren (TZR), die aus zwei Ig-ähnlichen Ketten bestehen und deren hypervariable Regionen durch Umordnungen der kodierenden Gene zu einer theoretischen Vielfalt von ca. 10^{18} verschiedenen TZR führen [1]. Im Thymus werden in verschiedenen Selektionen geeignete T-Zellen für das Lymphozytenrepertoire in der Peripherie ausgewählt [5]. Die positive Selektion erlaubt das Überleben der Thymozyten, die über den TZR eigene MHC-Komplexe (englisch: *major histocompatibility complex*) erkennen. Die nachfolgende negative Selektion eliminiert hochaffin gebundene T-Zellen durch regulierten physiologischen Zelltod (Apoptose) und entlässt nur niedrigaffin bindende T-Zellen in die Peripherie. In diesen Prozessen der zentralen Toleranz werden autoreaktive T-Zellen weitgehend vom MHC-restringierten Repertoire entfernt, wenn sie „Selbst-Antigene“ binden [2], die von MHC-Proteinen Dendritischer Zellen (DZ) und Thymusepithelzellen präsentiert werden. Das Transkriptionsregulierende Protein AIRE (*autoimmune regulator*) induziert dabei in Thymusepithel (MEC, *medullary epithelial cells*) die Expression von Selbst-Antigenen aus peripheren Geweben [5]. Am Ende der Entwicklung tragen die Zellen Rezeptoren, die hochspezifisch Antigene erkennen. Die TZR assoziieren mit nicht-kovalent gebundenen CD3-Molekülen, bestehend aus γ -, δ - und ϵ -Ketten, und mit ξ -Ketten, die für die Signaltransduktion durch ITAM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) benötigt werden. Autoreaktive Zellen können auch in der Peripherie kontrolliert werden. Die periphere Toleranz umfasst die Beseitigung autoreaktiver T-Zellen durch Apoptose [3] oder deren Versetzung in einen nicht-reagierenden (anergen) Zustand ohne Proliferation und Zytokinproduktion [6], sowie die Suppression durch regulatorische T-Zellen [7].

Der weitaus größte Teil der T-Zellen trägt TZR bestehend aus α und β Dimeren und kann ausschließlich Peptid-Antigene, oder selten Haptene - niedermolekulare Substanzen, die erst nach Bindung an Proteine immunogen wirken - in Verbindung mit eigenen MHC-Proteinen auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen erkennen. Dabei sind CD8⁺ T-Zellen auf die Präsentation von Antigenen durch MHC-Klasse-I-Moleküle beschränkt und CD4⁺ T-Zellen abhängig von der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-II-Proteine. Lösliche Antigene können nur von einer kleinen Population (ca. 2-5%) der T-Zellen mit γ und δ Ketten in Verbindung mit eigenen MHC-Molekülen erkannt werden [8]. MHC-Klasse-I-Proteine werden von fast allen kernhaltigen Zellen konstitutiv auf der Oberfläche getragen, während die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen nur in DZ, B-Zellen, Makrophagen und wenigen anderen Zelltypen (Endothel, Thymusepithelzellen) induziert werden kann. Zellen, die MHC-Klasse-II-Moleküle tragen, werden professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) genannt. Sie internalisieren

Antigene durch Phagozytose oder Rezeptor-gebundene Endozytose, prozessieren Proteine und präsentieren den T-Zellen in Lymphknoten kurze Antigen-Peptidfragmente (Epitope) mit MHC-Klasse-II-Molekülen.

Auf der Suche nach Pathogenen wandern naive, d. h. Antigen-unerfahrene, T-Zellen kontinuierlich vom Blut in sekundäre lymphatische Gewebe (Milz, periphere Lymphknoten (LK), mesenteriale LK, Peyers Patches) und suchen APZ nach spezifischen MHC-II/Antigen-Komplexen ab. Ohne Antigenerkennung wandern die Zellen über Lymphgefäße zurück in den Blutstrom (Rezirkulation). Erkennen naive T-Zellen Antigen/MHC-II-Komplexe und kostimulatorische Signale der APZ, formen sie für ca. 8-20 Stunden stabile Kontakte [9,10] und bringen aktivierungsassoziierte Moleküle (CD69, CD44, CD25) an ihre Oberfläche. Sie produzieren Interleukin-2 (IL-2), einen autokrinen Wachstums- und Differenzierungsfaktor für T-Zellen, erhöhen die Expression von Zytokinrezeptoren (u. a. des IL-2-Rezeptors CD25) und bilden Zytokine, die zur Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen (T_{EFF}), aber auch zu Effektorgedächtniszellen (*effector memory*, T_{EM}) und zentralen Gedächtniszellen (*central memory*, T_{CM}) führen. T_{CM} -Zellen zeigen im Gegensatz zu T_{EM} -Zellen keine sofortigen Effektorfunktionen. Bei erneutem Antigenkontakt proliferieren Gedächtniszellen schneller und zeigen sich sensibler gegenüber Antigenstimulation, indem sie auf geringere Antigenmengen reagieren [11]. Aktivierte T-Zellen stimulieren durch ihre Zytokinproduktion nicht nur die eigene Proliferation, sondern aktivieren auch B-Zellen, Makrophagen und Leukozyten und übernehmen damit bei der Regulierung humoraler Immunantworten eine wichtige Rolle. Supprimierende T-Zellen (s. Kapitel 1.4) und deren Zytokine können Immunreaktionen inhibieren. Wird das Antigen als Stimulus beseitigt, sterben die T-Zellen durch Apoptose oder kehren in einen ruhenden Zustand zurück. Dadurch wird das homöostatische Gleichgewicht der unterschiedlichen T-Zellen des Repertoires wieder hergestellt.

1.3 Kostimulatorische Signale bei der Aktivierung von T-Zellen

Für die erfolgreiche Aktivierung naiver T-Lymphozyten sind zwei Signale erforderlich [12,13]. Das erste Signal wird über die Interaktion des TZR mit dem Antigen/MHC-Komplex körpereigener APZ ausgelöst und sichert die Spezifität der Immunreaktion. TZR-Signale allein, ohne weitere kostimulatorische Signale, führen meist zu Anergie oder Zelltod [14]. Dadurch wird der Organismus vor autoimmunen Reaktionen geschützt, die sich aufgrund der Affinität und Reaktivität einiger TZR für eigene MHC-Moleküle entwickeln könnte. Das zweite Signal erfolgt Antigen-unabhängig durch die Interaktion von Kostimulationsmolekülen der T-Zellen mit Rezeptoren der APZ und bewirkt eine stabile T-Zellaktivierung. Das wichtigste kostimulatorische Molekül der T-Zellen ist das konstitutiv exprimierte CD28-Molekül [1]. Es bindet an die Moleküle

B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf den APZ. Die CD28-vermittelten Signale stabilisieren die mRNA von Zytokinen und verstärken die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) und NF- κ B (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells*) [15,16]. Die Expression anti-apoptotischer Proteine und die Bildung und Sekretion des Wachstumsfaktors IL-2 fördern die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen in Effektor T-Zellen. Andere kostimulatorische Rezeptoren der T-Zellen wie ICOS (*inducible costimulator*), CD40-Ligand und Komponenten des angeborenen Immunsystems verstärken ebenfalls TZR-Signale [16,17]. Für den Erhalt der Homeostase ist es ebenso wichtig, dass die Aktivierung von T-Zellen supprimiert und beendet werden kann. Interaktionen von z. B. PD-1 (*programmed death-1*), BTLA (*B and T cell attenuator*) und vor allem von CD152-Molekülen mit ihren Rezeptoren auf den APZ limitieren die T-Zellaktivierung und dienen dem Schutz vor Autoimmunität und Allergien. Auf die gravierende Rolle von CD152-Signalen bei der Beendigung der T-Zellaktivierung und auf dessen immunmodulatorische Fähigkeiten wird in Kapitel 1.3.1 näher eingegangen.

Neben der geregelten Expression kostimulatorischer Moleküle auf T-Zellen trägt auch die Expression der kostimulatorischen Rezeptoren auf professionellen APZ dazu bei, die Balance zwischen Immunreaktionen auf körpereigene Antigene und Immunschwäche zu erhalten. Zur Aktivierung naiver T-Zellen eignen sich DZ von allen professionellen APZ am besten, denn sie exprimieren die höchste Dichte an kostimulatorischen Molekülen. Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen besitzen eine niedrigere Aktivierungsschwelle und können bei erneutem Kontakt mit bekannten Erregern auch durch B-Zellen und Makrophagen stimuliert werden [1]. Dadurch wird eine schnellere Expansion der T-Zellen erreicht.

1.3.1 Das kostimulatorische Molekül CD152

CD152 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*; CTLA-4) ist ein 33-37 kDa Transmembran-Glycoprotein aus der Immunoglobulin (Ig)-Superfamilie und liegt als Homodimer kovalent gebunden vor. CD152 ist strukturell homolog zu dem Kostimulationsmolekül CD28 und bindet wie dieses an CD80- und CD86 Moleküle, jedoch mit mindestens 20-fach höherer Avidität als CD28-Rezeptoren [18,19]. Aufgrund unterschiedlicher Expressionskinetiken interagieren CD152-Moleküle vorwiegend mit CD80-Molekülen. Die Bindung von CD152-Homodimeren an zwei CD80-Dimere führt zur Kreuzvernetzung und zur Formation komplexer reißverschlussähnlicher Verbindungen [20]. Da die Konformation der CD152-Moleküle nicht durch die Bindung an CD80/CD86-Moleküle geändert wird, ist die gebildete Netzstruktur wahrscheinlich für die Signalinduktion relevant [21]. Außerdem wird durch die Vernetzung der

CD152/CD80-Dimere die lokale Konzentration der CD152-Moleküle erhöht und könnte durch sterische Hemmung die Konzentration anderer Signalmoleküle senken [21].

Im Gegensatz zu konstitutiv exprimierten CD28-Molekülen wird die Transkription und Translation von CD152 erst durch die T-Zellaktivierung induziert [22]. Bereits eine Stunde nach Aktivierung naiver T-Zellen kann CD152-mRNA nachgewiesen werden [22] und die gebildeten CD152-Proteine reichern sich überwiegend in intrazellulären Vesikeln an [23]. Dabei weist die gesteigerte intrazelluläre Expression von CD152-Molekülen nach der sekundären Stimulation von T-Zellen, verglichen mit der primären Aktivierung, auf die besondere Bedeutung von CD152 auf Antigen-erfahrene Zellen hin [24]. Bei der Verlagerung intrazellulär gespeicherter CD152-Moleküle auf die Zelloberfläche sammeln sie sich in der immunologischen Synapse (IS), dem Ort des TZR-Engagements, in „*lipid rafts*“ an. CD152-Moleküle intervenieren dort mit TZR- and CD28-Aggregaten, womit die T-Zellaktivierung generell begrenzt wird [25].

Wegen der fundamentalen Bedeutung von CD152-Signalen für die Suppression von Immunreaktionen wird die Expression der CD152-Proteine auf der Zellmembran, die Voraussetzung für die Ausübung der immunmodulatorischen Funktionen ist (s. Kapitel 1.3.2) [26], streng reguliert. [27]. CD152-Proteine werden in Clathrin-abhängigen Endozytoseprozessen rasch von der Zelloberfläche entfernt und erst die Stabilisierung der CD152-Moleküle auf der Oberfläche ermöglicht die Auslösung von CD152-Signalen. Die stabile Expression von CD152-Molekülen wird durch die T-Zellaktivierung in Anwesenheit von CD28-Signalen induziert, die zur Phosphorylierung des YVKM-Motivs in der zytoplasmatischen Domäne der CD152-Moleküle führt [22,28]. Die Phosphorylierung der CD152-Moleküle verhindert die Bindung von Clathrin-assoziiertem Adapterprotein AP-2 an die zytoplasmatische Domäne und unterbindet die Internalisierung der CD152-Proteine [28]. Aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimieren transient CD152-Moleküle auf der Oberfläche [14]. 24 Stunden nach T-Zellaktivierung sind CD152-Moleküle mit sensitiven Methoden auf der Zellmembran nachweisbar; die maximale Oberflächenexpression wird nach 48-72 Stunden erreicht [24,29]. Dabei wird die Retention der CD152-Rezeptoren auf der Oberfläche von der Stärke des TZR-Signals bestimmt [30,31]. T-Zellen mit hoher Affinität des TZR exprimieren mehr CD152-Moleküle auf der Oberfläche als T-Zellen mit niedriger TZR-Affinität. So können T-Zellklone mit hochaffinen Rezeptoren nicht expandieren und die frühe Aktivierungsphase der T-Zellen dominieren. Die Diversität Antigen-spezifischer T-Zellen bleibt erhalten [32].

1.3.2 Immunmodulatorische Mechanismen der CD152-Signale

CD152-Interaktionen lösen meist Gegenreaktionen zu CD28-Signalen aus. Sie senken die T-Zell-Proliferation und IL-2-Produktion und führen zur Beendigung von Immunantworten

[33,34]. Die intrinsische Wirkung der CD152-Signale auf die T-Zellen selbst beruht sowohl auf kompetitiven Mechanismen mit CD28-Rezeptoren als auch auf direkten negativen Signalen, die von der zytoplasmatischen Domäne des CD152-Moleküls ausgehen [31,35]. Diese enthält zwei Tyrosinreste und einen prolinreichen Abschnitt, wo eine Vielzahl von Signalmolekülen binden können [36].

CD152- konkurriert mit CD28-Protein um CD80- und CD86-Moleküle auf APZ, bindet diese aufgrund der höheren Affinität verstärkt, und verhindert damit CD28-CD80/CD86 Interaktion [19]. Stabil exprimierte CD152-Moleküle können entsprechend auch ohne zytoplasmatische Domäne erfolgreich T-Zell-Funktionen inhibieren [37]. Die Rekonstitution von CD152-defizienten Tieren mit CD152-Proteinen ohne zytoplasmatische Domäne konnte die Lymphoproliferation allerdings nicht verhindern [37] und deutet auf zusätzliche Effekte von CD152-Signalen auf intrazelluläre Signalwege hin. Das YVKM-Motiv der intrazellulären Region von CD152-Rezeptoren, das SH2 (*Src-homology 2*)-Domänen bindet, kann mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 (SH2-enthaltende Phosphatase) interagieren [38] und könnte über die Dephosphorylierung der ζ-Kette des TZR-Komplexes TZR-Signale behindern [39]. An die zytoplasmatische Region des CD152-Moleküls bindet auch die Serin/Threonin Phosphatase 2A (PP2A) [40]. PP2A kann die Signalwege von TZR und CD28-Molekülen durch direkte Konkurrenz um das Signalmolekül Phosphoinositol-3-Kinase (PI3'K) oder durch Inhibierung von dessen Zielmolekül Akt (auch Proteinkinase B (PKB) genannt) regulieren. PP2A bindet und inaktiviert CD152-Moleküle, wenn diese auf der Oberfläche exprimiert sind, aber nicht mit Liganden interagieren [36]. Bei der T-Zellaktivierung dissoziiert PP2A von CD152-Molekülen und kann das Molekül Akt des CD28-Signalweges binden und blockieren [41]. In der Folge wird die Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen gesenkt, indem die Akkumulation von AP-1, NF-κB und NF-AT im Nukleus verhindert wird [33,42]. CD152-Signale reduzieren die Proliferation der T-Zellen nicht nur durch Verminderung der IL-2-Transkription [33] und geringere Expression von IL-2-Rezeptoren, sondern auch durch die Inhibierung von Zyklin D3, zyklinabhängigen Kinasen 4 und 6 und durch die Degradierung des Zellzyklusinhibitors p27^{kip1} [33], woraus ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase resultiert. Die extrinsische Wirkung der CD152-Moleküle beruht auf Signalen der CD80/CD86-Moleküle, die in den APZ die Produktion des Stoffwechsellenzym IDO (Indoleamin 2,3-Dioxygenase) induzieren können [43]. IDO baut die Aminosäure Tryptophan ab, die essentiell für die Proliferation von T-Zellen ist [44].

Obwohl CD152-Signale meist mit negativen Regulationsmechanismen in Verbindung gebracht werden, zeigt sich die funktionelle Plastizität des Moleküls in der Fähigkeit, die T-Zellaktivierung auch positiv regulieren zu können (Abb. 1). CD152- und CD28-Signale können bei der T-Zellproliferation synergistisch wirken [45], in Abwesenheit von CD28-Molekülen können CD152-Signale die klonale T-Zellexpansion verstärken [46] und bei der Thymozytenentwicklung

können CD152-Interaktionen zur Aktivierung doppelpositiver ($CD4^+CD8^+$) Thymozyten beitragen [47]. Die immunmodulatorische Wirkung von CD152-Signalen wird auch im Schutz vor Apoptose von CD152-oberflächenexprimierenden Zellen deutlich, die durch das Fas-System, der Interaktion von Fas (CD95) mit Fas-Ligand (FasL, CD95L), ausgeübt wird. Der Schutz wird über die PI3'K-abhängige Akt-Aktivierung und folgender Inaktivierung des FasL-Transkriptionsfaktors FOXO3 (*forkhead box O3*, FKHL1) vermittelt [48–50]. PI3'K inaktiviert das proapoptotische Molekül Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*) durch Phosphorylierung [51], so dass dieses nicht mehr mit Proteinen der BCL-Familie (*B-cell lymphoma*) binden kann und die anti-apoptotische Wirkung von z. B. Bcl-2 induziert wird [48]. Eine erhöhte Oberflächenexpression von CD152-Molekülen auf T_H2 -Zellen führt zu besserer Resistenz gegenüber dem aktivierungsinduzierten Zelltod (*AICD*, *activation induced cell death*). Dies läßt die Zellen bis zum Ende einer Immunantwort überleben [24,48], so dass sie Vorläufer von Gedächtniszellen bilden könnten.

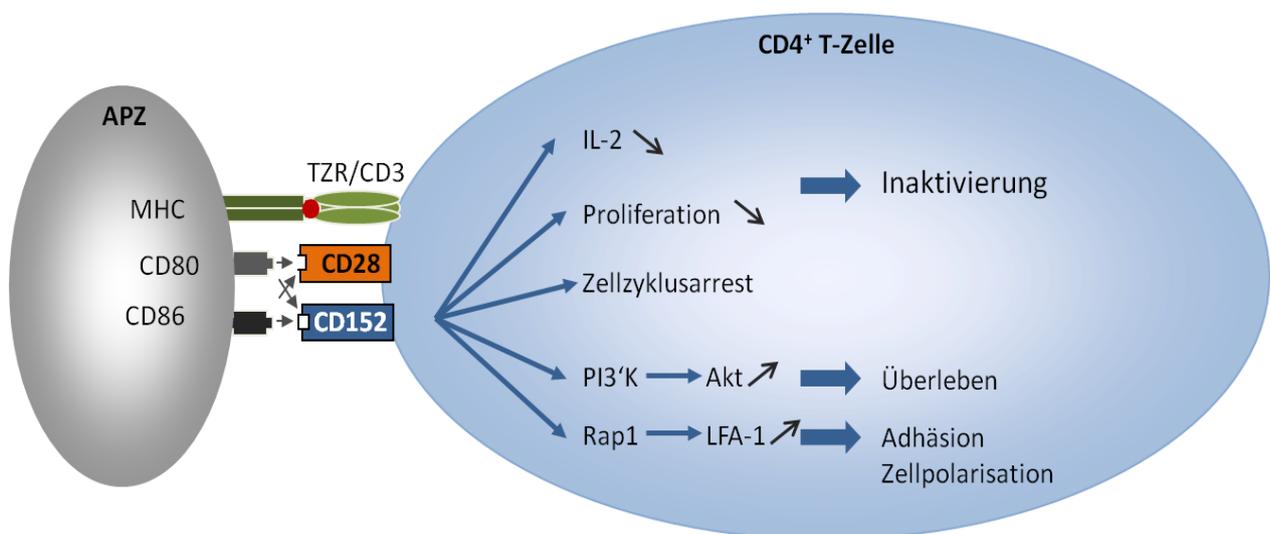


Abb. 1: Übersicht über intrinsische Wirkungen des kostimulatorischen Signalmoleküls CD152 auf $CD4^+$ T-Zellen. Signale von membranständigen CD152-Rezeptoren auf $CD4^+$ T-Zellen, die mit CD80 und CD86 Molekülen auf APZ interagieren, hemmen die Proliferation der Zellen u. a. durch reduzierte IL-2-Produktion und Zellzyklusarrest. Sie führen zur Inaktivierung der T-Zellen. CD152-Signale steigern durch PI3'K-abhängige Aktivierung anti-apoptotischer Akt-Moleküle das Überleben der Zellen. Über die Aktivierung der GTPase Rap1 wird die Adhäsionsaktivität des Integrins LFA-1 gesteigert und die Polarisierung der Zelle mit der Ansammlung von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen am Frontende der Zellen eingeleitet. Das Schema der CD152-Funktionen stellt nur die für diese Arbeit relevanten CD152-Funktionen dar. Es basiert auf Forschungsergebnissen, die zu verschiedenen Zeitpunkten der T-Zellaktivierung mit unterschiedlichen Methoden ermittelt wurden. Die Effekte müssen weder grundsätzlich noch zeitgleich erfolgen.

Die Signalwege der kostimulatorischen Moleküle CD28 und CD152 zeigen große Übereinstimmungen. So werden CD28-Signale nach Assoziation mit PP2A ebenfalls blockiert [40] und sowohl CD28- als auch CD152-Moleküle können mit PI3'K interagieren [52] und Akt phosphorylieren [49,53]. Möglicherweise entziehen CD152-Moleküle der CD28-abhängigen Kostimulation PI3'K, indem PP2A gegen PI3'K ausgetauscht wird [36]. CD152-Signale können die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen nicht nur über die Modulation der TZR/CD28-Signalwege regulieren, sondern auch über direkte CD152-Signale. Diese können wie CD28-Proteine die E3 Ubiquitinligase Cbl-b (*Casitas B-lineage lymphoma B*) regulieren, die Immunreaktionen über die Verfügbarkeit von Antigenrezeptoren und Signalmolekülen steuert [54]. Während CD28-Signale die Cbl-b-Expression vermindern, führen CD152-Interaktionen zur Reexpression von Cbl-b, wodurch die Aktivierungsschwelle von TZR-Signalen erhöht wird.

Die Reorganisation des Zytoskeletts, die für die Mobilität und Adhärenz der Zellen unerlässlich ist (s. Kapitel 1.5), wird ebenfalls durch CD152-Moleküle beeinflusst. CD152-Signale aktivieren als Gegenspieler zu CD28-Signalen die Integrin-aktivierende GTPase (*guanosine triphosphatase*) Rap1 [55,56]. Rap1 erhöht die LFA-1 (*leukocyte-function-associated antigen-1*)-abhängige Adhäsion und die Zellpolarisation über das Effektormolekül RAPL (*regulator of adhesion and cell polarizaton enriched in lymphoid tissues*) [57,58]. CD152-Signale können die PI3'K-abhängige Polarität der T-Zellen induzieren [59] und die Kontaktbereiche und Interaktionszeiten zwischen APZ und T-Zellen vermindern, so dass die TZR-induzierte Formation von Mikroaggregaten mit ZAP70-Signalmolekülen (*zeta-chain-associated protein kinase 70*) und die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium gestört werden [60]. Über diese Mechanismen könnten CD152-Signale die TZR-vermittelten Stopp-Signale für die Antigenerkennung beenden und die Zellbewegung beschleunigen [61].

1.3.3 Pathologie der CD152-Defizienz

Die elementare Bedeutung von CD152-Signalen bei der Begrenzung von Immunantworten durch die Beendigung der Zytokinproduktion und Proliferation zeigt sich in CD152-defizienten Mäusen. Diese Tiere werden gesund geboren, der Thymus ist normal groß. Bereits 5-6 Tage nach der Geburt wird ein Großteil der T-Zellen aktiviert und infiltriert nicht-lymphoide Gewebe. Das CD4-dominierte lymphoproliferative Syndrom führt zu Gewebeschädigungen u. a. mit Myokarditis, Pankreatitis, Splenomegaly, Lymphadenopathie und innerhalb von 3-5 Wochen zum Tod [62,63]. Im humanen System wird die Relevanz von CD152-Signalen in Polymorphismen des *ctla-4*-Gens deutlich. Das *ctla-4*-Gen besteht aus vier Exons, die Signalsequenz, Liganden-bindende Domäne, Transmembrandomäne und zytoplasmatische Region kodieren. Besonders Polymorphismen im Exon 1 sind oft mit Autoimmunkrankheiten wie

Rheumatoider Arthritis (RA) [64], Diabetes Typ 1 [65], Multipler Sklerose (MS) [66], Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) [67] und Schilddrüsenerkrankungen assoziiert [68,69]. Auch lösliches CD152-Protein, das sowohl in Mäusen als auch in Menschen durch alternative Spliceformen gebildet wird, wird mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Lösliche CD152-Proteine finden sich vermehrt im Blut von Patienten mit SLE [70], Morbus Basedow [71] und Myasthenia Gravis [72]. Die Behandlung mit blockierenden CD152-spezifischen Antikörpern kann über verstärkte T-Zellantworten zur Beseitigung des Parasiten *Nippostrongylus brasiliensis* [73] führen und die Remission immunogener Tumore verbessern [74,75]. Die Therapie mit CTLA-4-Ig, einem Fusionsprotein aus der externen Domäne von humanen CD152 mit einem Fragment von humanem IgG1, lindert im murinen Modell Kollagen-induzierte Arthritis [76], verzögert die Manifestation von SLE [77] und wird erfolgreich bei der Behandlung RA-Patienten eingesetzt [78]. Die Wirkung von CTLA-4-Ig basiert auf mehreren Mechanismen: CTLA-4-Ig bindet an CD80/CD86-Moleküle auf APZ und verhindert dadurch kostimulatorische Signale für die T-Zellaktivierung über CD28- und CD152-Moleküle. In DZ löst die CTLA-4-Ig-Bindung die Induktion von IDO aus, das die Lymphozytenaktivierung über immunregulatorische Tryptophanabbauprodukte inhibiert [79]. CTLA-4-Ig kann, unabhängig von der IDO-Induktion, zur Apoptose von T-Zellen führen [49]. Dies wurde in pro-inflammatorischen CD28^{null} T-Zellen, die bei chronischen Entzündungen unabhängig von CD28-Signalen aktiviert werden und bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie RA und MS vermehrt auftreten, nachgewiesen [49].

1.4 Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen zu T_H1-, T_H2-, T_H17 oder regulatorischen T-Zellen

Einige CD4⁺ T-Zellpopulationen wie natürliche regulatorische T-Zellen (nT_{reg}) und natürliche Killer-(NK) T-Zellen verlassen den Thymus bereits als eigenständige, voneinander getrennte Linien. T-Zellen, die bei der positiven Selektion mit hochaffinen TZR körpereigene Peptide binden, könnten zur Ausbildung von nTreg führen [80]. Andererseits entwickeln sich naive CD4⁺ T-Zellen durch Stimuli, die früh bei Immunantworten präsent sind, in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen. Die Differenzierung zu T_H1-, T_H2-, T_H17- oder induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg) wird von verschiedenen Faktoren wie Dauer und Stärke des TZR-Signals beeinflusst, wobei schwache Signale [10,81], geringe Antigenendosis [82] und Fehlen des kostimulatorischen Rezeptors CD152 [83,84] die Differenzierung zu T_H2-Zellen fördern. Starke TZR-Stimulation, hohe Antigenkonzentrationen und die Anwesenheit des kostimulatorischen Moleküls CD152 führen zur Ausbildung von T_H1-Zellen [85]. Die Differenzierung in verschiedene Subpopulationen wird auch von Molekülen auf den APZ und vom vorherrschenden Zytokinmilieu geprägt [86].

IL-12 ist der wichtigste Faktor zur Induktion inflammatorischer T_H1 -Zellen. Interferon- γ (IFN- γ) fördert die Stimulation der IL-12-Produktion von Komponenten des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und DZ und damit die T_H1 -Differenzierung. IFN- γ wird z. B. von NK [87] gebildet und führt über den Transkriptionsfaktor T-bet zu weiterer IFN- γ -Produktion [88] sowie funktioneller IL-12-Rezeptorexpression auf T-Zellen. T_H1 -Zellen produzieren ihrerseits Zytokine wie IFN- γ , IL-2, TNF- α [89] und Lymphotoxin- α (LT- α) und steuern die Produktion von Antikörpern des IgG2a-Isotyps. T_H1 -Zellen tragen durch die Aktivierung von Makrophagen vor allem zur Beseitigung intrazellulärer Pathogene wie z. B. Leishmania-Protozoen bei [90]. Andererseits wird die exzessive Aktivierung von T_H1 -Zellen als Ursache bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie z. B. Diabetes mellitus Typ 1, RA und MS [91] und bei inflammatorischen Reaktionen wie z. B. Granulomen angesehen.

IL-4 löst die Differenzierung zu T_H2 -Zellen über die Aktivierung von Stat (*signal transducers and activators of transcription*)-6 und folgender Erhöhung des Transkriptionsfaktors GATA-3 aus. Differenzierte T_H2 -Zellen bilden selbst Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 oder IL-25), antagonisieren IFN- γ und hemmen die Aktivierung von Makrophagen. T_H2 -Zellen fördern vor allem Immunantworten, die über die Antikörper-Isotypen IgG1 und IgE [92,93], Mastzellen und Eosinophile vermittelt werden. Diese sind bei Wurminfektionen und immunpathologisch bei Asthma und Allergien, reaktiver Arthritis [94] und chronischen T-Zellaktivierungen (z. B. SLE) von Bedeutung.

Im Jahr 2005 wurden T_H17 -Zellen als eigenständige T-Zellpopulation beschrieben [95]. Die TZR-Aktivierung auf $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von IL-6 und TGF- β (*transforming growth factor*- β) führt zur Induktion von T_H17 -Zellen [96]. Die weitere Differenzierung von T_H17 -Zellen wird über IL-21 gefördert und von IL-23 stabilisiert [97]. ROR γ t wurde als entscheidender Transkriptionsfaktor identifiziert [98] und Stat-3 gilt als Signalübermittler von IL-6, IL-21 und IL-23 als unverzichtbar für die IL-17-Produktion [99]. T_H17 -Zellen produzieren IL-17a, IL-17f, die für die Immunabwehr Neutrophile rekrutieren und aktivieren, wie auch IL-21 und IL-22. T_H17 -Zellen dienen dem Schutz vor extrazellulären Bakterien [100] und Pilzkrankungen [101]. Autoimmunerkrankungen wie MS [102], SLE [103], RA [104] und entzündliche Darmerkrankungen [105], die zunächst als T_H1 -Zell-vermittelt galten, sind durch starke IL-17-Konzentrationen in Blut und entzündetem Gewebe gekennzeichnet und werden zumindest teilweise durch T_H17 -Zellen ausgelöst.

Ca. 5-10 % der $CD4^+$ T-Zellen unterdrücken Immunreaktionen bei Autoimmunerkrankungen, Transplantationen und Tumoren [106–108]. Die Suppression wird über die Produktion von TGF- β , IL-10, und IL-35 [109,110] übermittelt oder über direkten Zell-Zell-Kontakt ausgeübt [111] und hemmt die Proliferation und Zytokinproduktion von T_{EFF} -Zellen. Neben IL-10 produzierenden

Tr1 (*T regulatory type 1*)-Zellen [112] und TGF- β bildenden T_H3-Zellen [113] sind vor allem die mittlerweile gut charakterisierten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) an diesen Prozessen beteiligt. Sie werden durch die konstitutive Expression von CD25, CD152 und GITR (*glucocorticoid-inducible tumor necrosis factor receptor*) charakterisiert [7,108]. TGF- β induziert FoxP3 (*forkhead box P3*), den wichtigsten Transkriptionsfaktor für nT_{reg}-Zellen, [114], die bereits im Thymus gebildet werden. Zusammen mit IL-2-aktiviertem Stat5 führt TGF- β auch zur Differenzierung von induzierbaren T_{reg}-Zellen (iT_{reg}) [115] bei chronischer [116] oder suboptimaler [117] Stimulation sowie bei kontinuierlicher Gabe geringer Antigenmengen [118]. T_{reg}-Zellen spielen eine kritische Rolle bei der Erhaltung der Selbsttoleranz, Regulation von Immunantworten und Lymphozytenhomöostase [119].

Die Flexibilität der CD4⁺ T-Zellen, sich bei verändertem Zytokinmilieu in Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen zu entwickeln, wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Übersicht Zhou et al. [120]). Follikuläre CD4⁺ T_H-Zellen (T_{FH}), die in Follikeln und Keimzentren B-Zell-Hilfe leisten, können sich unabhängig von anderen T-Zellsubpopulationen entwickeln [121] und aus T_H1, T_H2, T_H17 und FOXP3⁺CD4⁺ T-Zellen hervorgehen [122,123]. Die Entdeckung weiterer CD4⁺ T-Zellsubpopulationen wie die IL-9 produzierenden T_H9-Zellen [124], und IL-22-produzierenden T_H22-Zellen [125], führt aktuell zur Diskussion über die Bestimmung neuer Kriterien zur Unterscheidung von eigenständigen T-Zelllinien und T-Zell-Differenzierungsstadien [126]. Das Wissen um die Hierarchie der Faktoren (Zytokine, Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Modulationen), die entweder Stabilität oder Plastizität der T-Zellen hervorrufen, ist von entscheidender Bedeutung für therapeutische Interventionen. Immunantworten könnten durch eine Reprogrammierung differenzierter T-Zellen, z. B. von T_{reg}- zu T_{Eff}-Zellen oder von T_H17- zu T_H1-Zellen, manipuliert werden.

1.5 Rezirkulation von Lymphozyten: das Mehrschrittmodell

Essentielle Voraussetzung für die funktionierende Immunreaktion ist das Zusammentreffen der Abwehrzellen mit Pathogenen bzw. APZ. Auf der Suche nach Krankheitserregern patrouillieren Leukozyten permanent durch Blut, sekundäre lymphatische Organe und Lymphgefäße. Diese sogenannte Rezirkulation und die Einwanderung Antigen-erfahrener Zellen in selektive Gewebe (*homing*) wird über die Kombination verschiedener Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren vermittelt. Ausgelöst wird die Leukozytenmigration zum Entzündungsherd durch Zytokine, die von Makrophagen und Endothelien nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten produziert werden. Später wird der Prozess durch die Zytokine bereits eingewanderter T-Zellen unterstützt. Das Verlassen des Blutes und der Übertritt in entzündetes Gewebe vollziehen sich nach dem „*Multistep*“-Modell in vier sequentiellen Schritten (Abb. 2) [127].

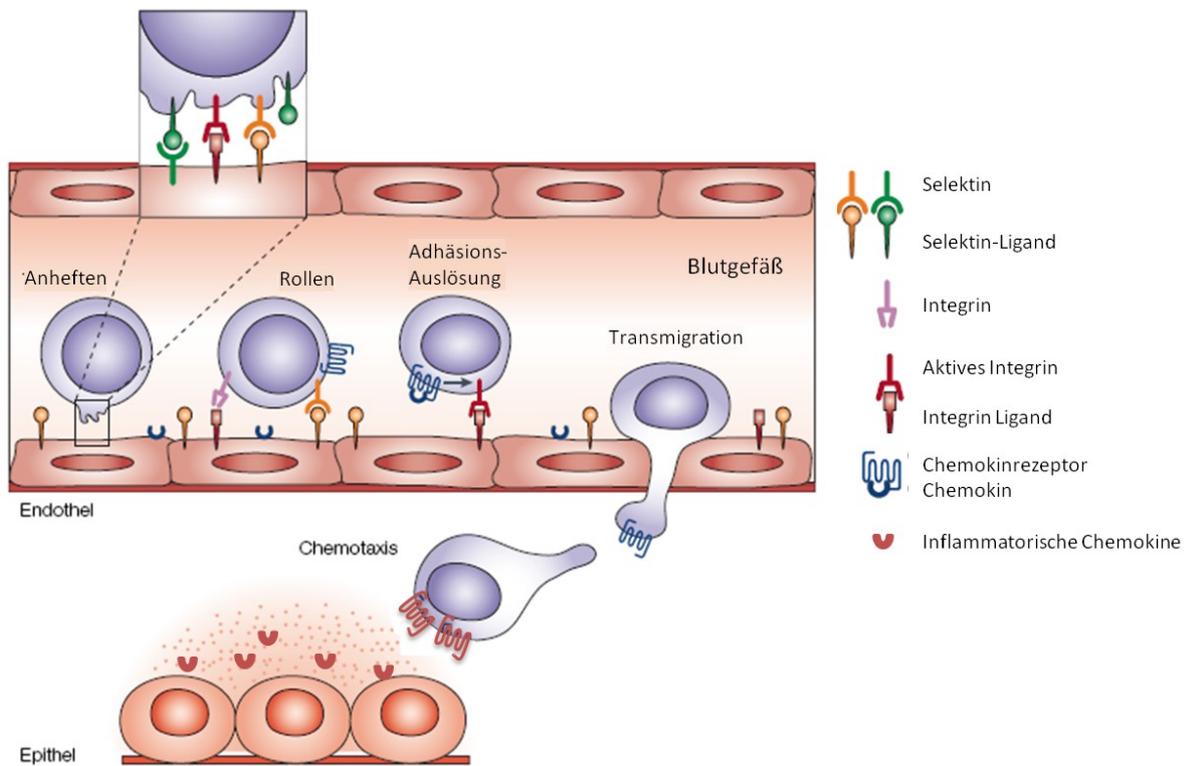


Abb. 2: Signale über Chemokinrezeptoren leiten T-Zellen in entzündete Gewebe. Eine Kaskade von Adhäsions- und Aktivierungsprozessen steuert die Lokalisierung der T-Zellen. In Blutgefäßen zirkulierende Leukozyten binden über transiente Selektin:Selektin-Liganden- und Integrin:Integrin-Liganden-Interaktionen am Gefäßendothel. Bei Lymphozyten ermöglicht das Rollen über das Endothel die Suche nach Chemokinsignalen. Signale der Chemokinrezeptoren durch Chemokine lösen über die Aktivierung der Integrine die feste Adhäsion der Zellen am Endothel aus. Nach der Transmigration in extravaskuläre Regionen, migrieren Lymphozyten an Gradienten inflammatorischer Chemokine entlang zu spezifischen Geweben z. B. Epithelien (verändert nach Kunkel, EJ [128] und Rollins, BJ [129]).

Zunächst interagieren Selektinliganden (s. Kapitel 1.5.1) auf der Oberfläche von T-Zellen transient mit Selektinen des Endothels nachkapillärer Venolen. Die Expression von Selektinen wird dort durch z. B. von Makrophagen produziertes TNF- α induziert. Diese Interaktionen führen zu einer losen Anheftung der T-Zellen, die zusammen mit dem Blutfluss zum Rollen der T-Zellen über die Oberfläche des Endothels führt [130]. Durch die reduzierte Geschwindigkeit wird die Bindung von Chemokinrezeptoren der T-Zellen mit Chemokinen ermöglicht, die durch Kopplung an Heparinsulfatglucosaminoglycane des Endothels in erhöhter Konzentration vorliegen. Die Chemokinbindung an Chemokinrezeptoren löst die Aktivierung von Integrinen und deren Konformationsänderung aus, wodurch die Affinität für die entsprechenden Adhäsionsmoleküle des Endothels (s. Kapitel 1.5.1) erhöht wird. Die Zellen werden durch die entstehende feste Adhäsion der T-Zellen mit dem Endothel an der Stelle der Antigenpräsentation zurückgehalten. Mit der transendothelialen Migration folgt der Eintritt ins Gewebe und die T-Zellen werden an

Chemokingradienten entlang zu den infizierten Geweben geleitet. Voraussetzung für die effiziente Migration ist die Zellpolarisation [131], d.h. die Formation einer anterior-posterior-Achse mit asymmetrischer Verteilung intra- und extrazellulärer Proteine. Ein Netzwerk aus Mikrofilamenten aus F-Actin, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten bestimmen mit der Reorganisation des Zytoskeletts die Zellmorphologie und Membranplastizität [132] und ermöglichen eine zielgerichtete Migration.

1.5.1 Adhäsion von T-Zellen: Integrine, Selektine und deren Liganden

Die Adhäsion wird über Selektine und Integrine vermittelt. Je nach Zelltyp sind andere Selektine auf der Oberfläche präsent und dirigieren die Zellen zu unterschiedlichen Geweben. Naive T-Zellen zeigen mehr L-Selektin, dessen Ligand auf hohen endothelialen Venolen (HEV) der Lymphknoten exprimiert wird. So gelangen naive T-Zellen vorwiegend in periphere Lymphknoten, in denen Immunantworten initiiert werden. Im Gegensatz dazu können Antigen-erfahrene Effektor- und Gedächtniszellen auch in nicht-lymphatische Gewebe einwandern, wenn dort das entsprechende Antigen präsentiert wird [133]. Durch vermehrte Expression von E-Selektinen, P-Selektinen und Integrinen - u. a. LFA-1, VLA-4 (*very late antigen-4*) und $\alpha 4\beta 7$ - binden aktivierte T-Zellen an Endothelien mit erhöhtem Level der Liganden, wie ICAM (*intracellular adhesion molecule*)-1, ICAM-2, VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*) und an Komponenten der extrazellulären Matrix [134]. Diese Moleküle der Ig-Superfamilie werden sowohl von endothelialen Zellen als auch von verschiedenen Leukozyten exprimiert und leiten die Zellen zusammen TZR- und Chemokin-induzierten Signalen bei der Emigration in extravaskuläre Gewebe [135].

1.5.2 Chemotaxis: Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die durch Adhäsionsmoleküle eingeleitete ungerichtete Migration der Zellen (Haptokinese) wird durch die Bindung von Chemokinen an ihre Chemokinrezeptoren zu einer zielgerichteten Bewegung erweitert. Diese Interaktion steigert die Zellmobilität (Chemokinese) und bewirkt die gerichtete Zellwanderung entlang an Gradienten löslicher Chemokine (Chemotaxis) und zu an Gewebestrukturen gebundener Chemokine (Haptotaxis) [136].

Chemokine

Chemokine sind kleine (7-12 kDa), chemotaktische Zytokine, die nicht nur die Leukozytenmigration regulieren, sondern u. a. auch an Organentwicklungen, Angiogenese und Immunregulation beteiligt sind. Pathogenetisch spielen sie eine Rolle u. a. bei AIDS,

Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen und Krebs [137]. Nach Anordnung der beiden N-terminalen Cysteinreste ihrer Liganden, werden sie strukturell in zwei Gruppen eingeteilt; Cysteine der CC-Chemokine sind direkt benachbart, bei CXC-Chemokinen sind sie durch eine Aminosäure, bei CX3C durch drei Aminosäuren getrennt. Bei Entzündungen wirken CXC-Liganden (CXCL), die an CXC-Rezeptoren (CXCR) binden, hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten. CC-Liganden (CCL) binden an CC-Rezeptoren (CCR) und locken Monozyten, Lymphozyten und Eosinophile an [138]. Chemokine können auch anhand ihrer Funktionen und Expressionsmuster kategorisiert werden. Homöostatische Chemokine sind an der Entwicklung von Lymphozyten beteiligt und beeinflussen u. a. Adhäsion, Angiogenese und Proliferation [139]. Sie werden konstitutiv auf meist niedrigem Niveau auf der Oberfläche exprimiert und sind bei Bindung mit wenigen spezifischen Liganden für die basale Lymphozytenrezirkulation und für das „*Homing*“ unter nicht-entzündlichen Bedingungen von Bedeutung. Inflammatorische Chemokine bilden die Mehrheit, sie sind induzierbar und kontrollieren die Zellrekrutierung an Orten der Entzündung. Sie werden nach ihrer Induktion stark exprimiert und haben meist eine Vielzahl von Liganden [138].

Chemokinrezeptoren

Bislang sind etwa 20 humane Chemokinrezeptoren und ca. 50 Chemokine identifiziert worden. Die Bindungen zwischen diesen Partnern weisen ein hohes Maß an Redundanz auf; viele Chemokine können an mehrere Rezeptoren binden und die meisten Rezeptoren interagieren mit verschiedenen Chemokinen. Je nach Bindungspartner werden unterschiedliche Funktionen erfüllt. Die Bindung von CCL5 an CCR5 führt z. B. zur Transmigration, während die CCL1-Interaktion mit CCR5 den Arrest der Zellen nach sich zieht [140].

Über die Expression von Chemokinrezeptoren können verschiedene Zellpopulationen charakterisiert werden, z. B. dient CCR7-Expression zur Identifizierung naiver T-Zellen, T_{EFF}-Zellen und T_{EM}- und T_{CM}-Gedächtnis-T-Zellen [141]. CCR7 wird von naiven T-Zellen und T_{CM}-Zellen konstitutiv exprimiert und dirigiert die Zellen sowohl in lymphatische Gewebe [142] als auch in periphere, entzündete Gewebe [141]. CCR7-negative T_{EFF}- und T_{EM}-Zellen sind vornehmlich in nicht-lymphatischen Geweben lokalisiert und können nicht in periphere Lymphknoten eindringen. T_H1, T_H2 und T_H17-Zellen weisen unterschiedliche Profile inflammatorischer Chemokinrezeptoren auf. CXCR3, CXCR6 und CCR5 sind vorwiegend auf T_H1-Zellen exprimiert [143,144], während T_H2 Zellen durch die Expression von CCR3, CCR4 und CCR8 gekennzeichnet sind [143,145]. T_H17 Zellen tragen CCR6, CCR4, und zum Teil CCR2, CCR9 und CXCR3 auf der Oberfläche [146]. T_{reg}-Zellen wandern homöostatisch, reagieren aber auch auf entzündungsinduzierte Chemokine, um exzessive T-Zellexpansion und damit Autoimmunreaktionen zu verhindern. Die regulatorischen Funktionen von T_{reg}-Zellen in

ableitenden Lymphknoten sind abhängig von CCR4 und CCR7 [147,148], während die Migration in entzündetes Gewebe von CCR5 vermittelt wird [149].

In dieser Arbeit wurde die Chemotaxis untersucht, die über die homöostatischen Chemokinrezeptoren von CCR7 und CXCR4 und die inflammatorischen Rezeptoren CCR5 und CXCR3 vermittelt wird. Die wichtigsten Chemokinbindungspartner für diese Chemokinrezeptoren und die Verteilung dieser Rezeptoren auf verschiedenen Zellpopulationen sind in Tabelle 1 angegeben.

Rezeptor	Chemokinligand	Expressionsmuster	Funktion
CCR7 (CD197)	CCL19 (ELC), CCL21 (SLC)	Naive Zellen, T _{CM} Zellen, z.T. T _{reg} DZ	Migration zu ruhenden LK Interstitielle Mobilität in LK
CXCR4 (CD184)	CXCL12 (SDF-1)	T _{CM} , Naive Zellen B-Zellen, DZ, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen	Migration zu ruhenden LK
CCR5 (CD195)	CCL3 (Mip-1 α), CCL4 (Mip-1 β), CCL5 (RANTES)	T _H 1- Zellen, z.T. T _{reg} Makrophagen, DZ	Migration zu entzündetem Gewebe
CXCR3 (CD183)	CXCL9 (MIG)	Aktivierte T _H 1-Zellen, T _H 17, z.T. T _{reg} NK,CTL	Migration zu entzündetem Gewebe

Tabelle 1: Ausgewählte Chemokinrezeptoren, Liganden und deren Expression. Die Expressionsmuster auf verschiedenen Zellpopulationen, sowie die Bedeutung für verschiedene Aspekte der Migration sind angegeben [150]. Die in dieser Arbeit verwendeten Chemokinrezeptorliganden sind fett gedruckt hervorgehoben. T_{reg}, regulatorische T-Zellen; T_{CM}, *central memory* T-Zellen; DZ, Dendritische Zellen; NK, Natürliche Killerzellen; CTL, *cytotoxic T-lymphocytes*; LK, Lymphknoten.

CCR7 ermöglicht den Eintritt von T-Zellen in ruhende Lymphknoten [151], die interstitielle Mobilität innerhalb sekundärer lymphatischer Organe [152] und den Austritt aus peripheren Geweben [153]. Obwohl Gedächtniszellen aus peripheren Geweben über afferente Lymphgefäße in die Lymphknoten gelangen können [154], bleibt als Haupteintrittspforte der T-Lymphozyten der Weg über die HEV [155], die CCL21 konstitutiv exprimieren. Entsprechend enthalten Lymphknoten aus CCR7-defizienten Mäusen nur wenige naive Zellen, wodurch die Initiierung primärer Immunantworten gestört wird [156,157]. CXCR4 bindet selektiv CXCL12. Die essentielle Bedeutung von CXCR4 für die Lokalisierung hämopoetischer Stammzellen bei der Embryogenese und Organbildung wird durch die embryonale Letalität von CXCR4-defizienten Tieren deutlich [158]. T_{CM}-Zellen können durch die Expression von CXCR4 in ruhende Lymphknoten geleitet werden [151]. CXCR4 ist zusammen mit CCR5 als Eintrittspforte für HI-Viren in CD4⁺ T-Zellen bekannt geworden [159,160]. Die Expression von CCR5 und CXCR3 führt zur Migration von T_H1- [161] und T_{reg}-Zellen [149] in entzündete Gewebe. CCR5 und CXCR3 sind an T_H1-assoziierten Immunreaktionen und Autoimmunerkrankungen wie z. B. MS

[162], RA [163], entzündlichen Darmerkrankungen [164], Artherosklerose [165], Transplantatabstoßungsreaktionen [166] und Diabetes [167] beteiligt. Eine homozygote CCR5 Δ 32-Mutation, die zur Expression nicht funktioneller CCR5-Rezeptoren führt, schützt vor HIV-Erkrankungen, führt bei RA zu milderem Krankheitsverlauf [168] und verdeutlicht dadurch die Rolle von Chemokinrezeptoren als Ziel therapeutischer Ansätze.

1.6 Signalwege der Chemokin-vermittelten Migration

Chemokinrezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptor*, GPCR) mit sieben transmembranen Domänen und sind vorwiegend an Pertussistoxin (PTX)-sensible inhibitorische (i) G α -Untereinheiten gebunden [169]. Die Bindung von Liganden an GPCR führt zum Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat) an der α -Untereinheit des G-Proteins. α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten dissoziieren und leiten unterschiedliche Signalwege ein. α -Untereinheiten senken Adenosinmonophosphat (AMP)-Zyklasespiegel und aktivieren Kinasen der Src-Familie [170]. Sie begrenzen die Dauer aktiver Zyklen, indem die intrinsische Guanosintriphosphatase (GTPase)-Aktivität die inaktive GDP-Form wiederherstellt und die Assoziation mit $\beta\gamma$ -Untereinheiten ermöglicht. Für die Chemotaxis geht der entscheidende Schritt von der Freisetzung der $\beta\gamma$ -Untereinheit vom α -Molekül und dem G α -Rezeptor aus [171] (Abb. 3). Die G $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert Signalmoleküle wie PI3'K [172], das die schnelle Formation von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphaten (PIP₃) stimuliert; folgend wird Akt phosphoryliert und aktiviert. Dieser Signalweg wird in Kapitel 1.6.2 näher erläutert. Ein weiteres Effektormolekül der G $\beta\gamma$ -Untereinheit ist Phospholipase C (PLC). Biochemische Signale von PLC bei der *in vitro* Migration von T-Zellen wurden nachgewiesen [173]. Durch PLC generierte Inositoltriphosphate werden Diacylglycerin (DAG)-Signale und intrazelluläre Calciumspiegel transient erhöht, wodurch Adhäsion und Migration reguliert werden [174]. DAG-Signale aktivieren DAG-abhängige Proteinkinase C (PKC)-Isoenzyme, die bei der Signalgebung fast aller Oberflächenrezeptoren involviert und nicht spezifisch für Chemokin-signalwege sind [173,175]. Chemokine können auch die Aktivierung von MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) auslösen [176,177], eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, zu der u. a. die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) gehört.

Die für die Migration notwendige Zellpolarisierung wird über eine konzertierte Aktion vor allem von PI3'K-aktivierten Rho- und Ras-Familien der kleinen GTPasen gesteuert [178]. Rap1 aktiviert Integrine und leitet die Polarisierung ein [127]. Rac1 induziert die Lamellipodiaformation, Rho steuert die Kontraktion am posterioren Ende und Cdc42 fördert die Stabilisierung der Frontseite und gerichtete Mobilität.

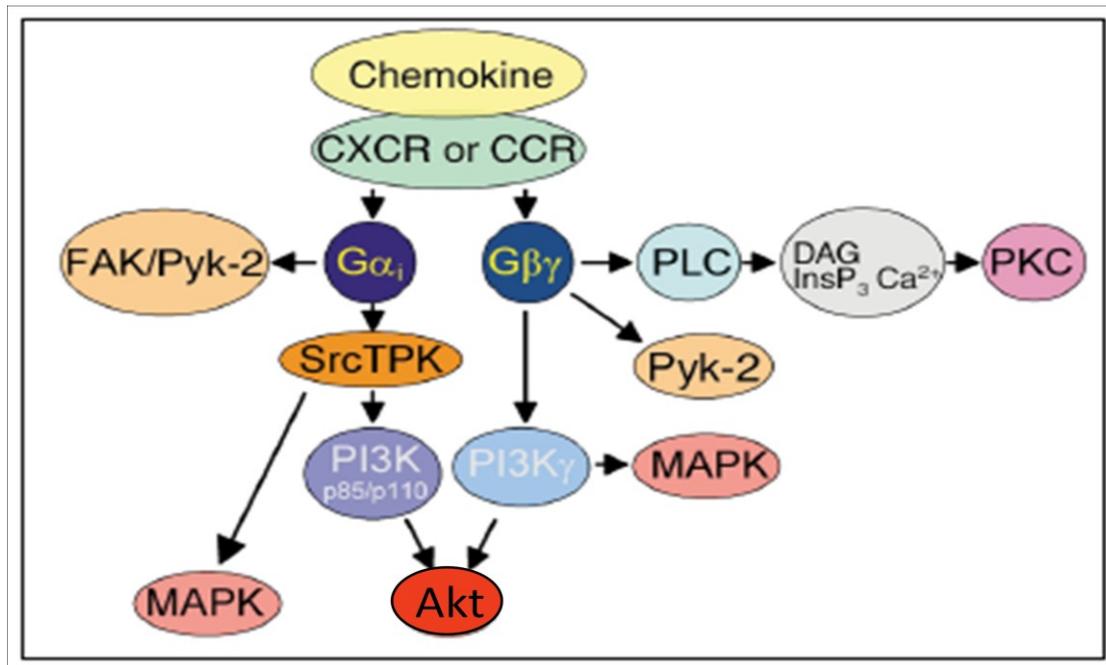


Abb. 3: Übersicht der wichtigsten Signalwege von Chemokinrezeptoren. Die Chemokinrezeptor-gekoppelten G-Protein-Untereinheiten α und $\beta\gamma$ aktivieren wichtige Signalmoleküle und steuern die Migration. Kleine GTPasen, die Migration modifizieren können, und mögliche Vernetzungen zwischen den Signalwegen sind nicht dargestellt. $G\alpha$ -Untereinheiten können Kinasen der Src-Familie und die Zytoskelett-assoziierten Kinasen FAK und Pyk-2, sowie MAPK aktivieren. $G\beta\gamma$ -Untereinheiten können über PI3'K das Signalmolekül Akt aktivieren und über den PLC-Signalweg PKC. FAK, *Focal Adhesion Kinase*; Pyk-2, *Proline-rich tyrosine kinase 2*; SrcTPK, Src Tyrosin Protein Kinasen; PI3'K, Phosphoinositol-3-Kinase; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; Akt (auch PKB), Proteinkinase B; PLC, Phospholipase C; DAG, Diazylglycerin; InsP₃, Inositol-1,4,5-Triphosphat; Ca²⁺, Calcium; PKC, Proteinkinase C. Schema nach Thelen, M [179]

Die Signalwege der Chemokinrezeptoren können von den bindenden Liganden beeinflusst werden. So führen die CCR2-Liganden CCL2 und CCL11 bei Bindung an CCR2 zu unterschiedlichen Aktivierungszuständen des Rezeptors, die in unterschiedliche Zellantworten mit verschiedenen Signalwegen umgesetzt werden; CCL2 interagiert mit CCR2 als Agonist, CCL11 wirkt antagonistisch. In der Folge werden verschiedene Isoformen der PI3'K selektiv aktiviert und die CCL11-vermittelte ERK-Aktivierung wird durch die CCL2-Bindung an CCR2 verhindert [180]. Einzelne Chemokinrezeptoren (z. B. CXCR7) lösen bei der Bindung von Liganden (CXCL12) keine Signale aus, sondern führen zur Internalisierung. Ihre Funktion könnte in der Beseitigung von Chemokinen an Entzündungsorten liegen [181]. Die Signaltransduktion kann auch variieren, je nachdem, ob die Chemokine löslich oder an Glycosaminoglycane der Endotheloberfläche gebunden präsentiert werden, oder ob durch Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren andere als $G\alpha_i$ -Proteine an den Rezeptor binden können [182,183]. Der Wechsel von $G\alpha_i$ - zu $G\alpha_q$ - bzw. $G\alpha_{11}$ -Proteinen nach der CXCR4- und CCR5-Ligandenbindung war in T-Zellen mit dem Verlust der chemotaktischen Fähigkeiten verbunden

[184]. Homodimere wurden in ruhenden Zellen für die Rezeptoren CXCR4 und CCR5 ebenso beschrieben [185] wie die Ligand-induzierte Formation von CXCR4- [186] und CCR2-Homodimeren [187] oder CCR2/CCR5-Heterodimeren [188]. Durch diese Konformationsänderungen könnten G-Protein-unabhängige Signalwege über Januskinasen und Stat-Proteine aktiviert werden [188], Affinitäten für die Liganden geändert oder Bindungsstellen reduziert werden [189]. Die Oligomerisierung von Chemokinen, z. B. CCL2, CCL4, CCL5, CXCL10 verstärkt die Rekrutierung von Leukozyten *in vivo* [190,191].

1.6.1 Desensibilisierung von Chemokinrezeptoren durch GRK2

Die Migrationsfähigkeit von Zellen wird über die Expression der Chemokinrezeptoren durch Prozesse der Desensibilisierung, Internalisierung und des Recyclings gesteuert. Die Bindung von Liganden führt zur Phosphorylierung und Internalisierung der Rezeptoren. Diese Prozesse werden nicht durch Pertussistoxin PTX blockiert und sind unabhängig von der Kopplung an G-Proteine. Die reversible Phosphorylierung der Chemokinrezeptoren über PKC erfolgt innerhalb von 2-20 s. Danach binden Liganden-aktivierte Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) und werden innerhalb von 30 s bis 2 Min. phosphoryliert [192]. Diese Serin/Threoninkinasen leiten die Desensibilisierung der Chemokinrezeptoren ein. Die Rezeptorphosphorylierung fördert die Bindung von β -Arrestinen, wodurch eine erneute Bindung und Aktivierung der G-Proteine verhindert wird. Arrestin-gebundene, phosphorylierte Rezeptoren werden in Clathrin-abhängigen Prozessen in endosomale Kompartimente zur Degradierung internalisiert oder resensibilisiert und erneut an die Oberfläche gebracht [193].

Die Bedeutung der GRK für die adaptive Immunität lässt sich aus der starken Expression von GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 auf Zellen des Immunsystems schließen [194]. Auch werden viele Krankheiten mit Veränderungen der Aktivierung und Expression von GRK in Verbindung gebracht. Eine deutlich verminderte Expression von GRK2 und GRK6 weisen Patienten mit RA und MS auf [195,196]. Die reduzierte Expression von GRK2-Proteinen führte in Mäusen, die genetisch heterozygot für GRK2 sind, zu CCL4-induzierter Aktivierung von Akt und MAPK und verstärkte die Migration von T-Zellen [197].

1.6.2 PI3'K-induzierte Akt-Signale durch die Chemokin-Rezeptorbindung

Die Relevanz von PI3'K für die Migration wurde zunächst in Amöben (*Dictyostelium discoideum*) [198] und neutrophilen Granulozyten [199] nachgewiesen. Studien mit PI3'K-Inhibitoren oder genetischem Defekt von PI3'K belegen eine reduzierte chemotaktische Antwort bei *in vitro*- und *in vivo*-Migrationsversuchen [200,201]. PI3'K-Signale sind an verschiedenen

Aspekten der Migration beteiligt, z. B. Wahrnehmung von Chemokingradienten, Signalverstärkung, Aktin-Reorganisation und die daraus folgende Zellmobilität [202,203] und sie steuern die Gewebe-spezifische Migration von T_{EFF}-Zellen [204]. Die Aktivität von PI3'K kann durch Rho-GTPasen gesteigert werden [205]. Gegenspieler der PI3'K sind die Lipidphosphatasen PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) und SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*), die die Migration negativ beeinflussen [206,207].

In T-Lymphozyten lösen die meisten homöostatischen und inflammatorischen Chemokinrezeptoren über $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine die Aktivierung der p110 γ -Isoform von PI3'K [208], aber auch anderer PI3'K-Isoformen aus [208]. Die zentrale Funktion von PI3'K-Signalen und die Bedeutung einzelner Isoformen bei der Migration von T-Zellen zeigen sich in genetisch veränderten Tieren. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Tieren, die defizient für die katalytische Untereinheit von PI3'K γ (p110 γ) sind, zeigen verminderte Migration zu CXCL12, CCL19 und CCL21 [209]. Antigen-getriebene T-Zelllokalisierung beruht auf der Isoform p110 δ [210], die auch beim B-Zell-*Homing* dominant ist [209].

Hauptprodukte der aktivierten PI3'K sind die 3'Inositide PIP₂, PIP₃ und phosphorylierte Lipide, die insbesondere Rac-GTPase-spezifische-GEF regulieren [205] und damit die Zellpolarisierung steuern. Ein wichtiges Effektormolekül von PI3'K ist die Serin/Threonin Kinase Akt [211], das zunächst über seine PH (*pleckstrin homology*) Domäne zur Plasmamembran rekrutiert wird und PIP₂ bindet. Diese Schritte sind abhängig von PI3'K und werden durch die PI3'K-Inhibitoren Wortmannin und Ly294002 verhindert. Die Phosphoinositidabhängige Kinase 1 (PK1) phosphoryliert Akt zuerst am Threoninrest (Thr) 308 [212]. Anschließend wird durch Phosphorylierung des Serins (Ser) 473 durch PDK2 die vollständige Aktivierung von Akt ausgelöst. Die kritische Rolle von Akt-Signalen bei der Kontrolle von Überleben und Apoptose von Zellen ist lange bekannt [213]. Akt verhindert Apoptose durch die Phosphorylierung und Inaktivierung der Zielmoleküle Bad [214], FOXO Transkriptionsfaktoren [50], c-raf [215] und Caspase-9 [214]. Auch die Zellmobilität kann durch Akt-Signale reguliert werden, obwohl die Wirkung je nach Zelltyp und Akt-Isoform stark variieren kann. So wird die Migration von Epithelzellen einiger Gewebe durch Akt1-Signale gesenkt [216], während die der murinen Fibroblasten durch Akt1 gefördert und durch Akt2 gehemmt wird [217]. Die Bedeutung von Akt-Signalen für die Mobilität beruht auf Effekten der Zytoskelettorganisation und Zellpolarisierung. Das Zytoskelettprotein Aktin wurde als Zielmolekül von Akt-Signalen identifiziert [218] und die F-Aktin-Polymerisierung und Myosinanlagerung werden über Akt-Signale gesteuert [219,220]. In humanen T-Zellen wurde die Akt-Phosphorylierung durch Signale der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 nachgewiesen [176], während die Chemotaxis über CXCR3 nicht von PI3'K/Akt-Signalwegen, sondern von PLC-Signalen abhängig war [221]. Humane T_{reg}-Zellen zeigten nach Stimulation mit T_H2-assoziiertem CCL1 geringere Akt-Phosphorylierung und

verminderte Migrationskapazität [222] und murine T_H17 -Zellen wiesen PI3'K/Akt-abhängige Migration zu CCR2- und CCR6-Antagonisten auf [223]. Aktuelle Studien belegen, dass die Stärke der Akt-Aktivierung und die Bindung von PIP_3 an PDK1 T-Zellantworten bestimmen. Geringe Akt-Aktivität ist zwar ausreichend für T-Zellproliferation und Überleben, aber nicht für die Initiierung des migratorischen Programmes von T_{EFF} -Zellen. Ohne die Bindung von PIP_3 kann PDK1 nicht die Signale auslösen, die die Expression des Transkriptionsfaktors KLF-2 (*Krüppel-like factor 2*) in aktivierten T-Zellen beenden. Dadurch unterbleibt bei schwacher Akt-Aktivierung ein Wechsel der Chemokin- und Adhäsionsrezeptorprofile [224]. Dieser Wechsel ist jedoch für die Wiedererlangung der Mobilität nach der Antigenprägungsphase notwendig, damit Gedächtnis-T-Zellen besser als naive T-Zellen zu den Infektionsherden geleitet werden [142].

1.6.3 Chemokinrezeptorsignale und Kostimulation

Die Migrationsfähigkeit der Lymphozyten wird über das Zusammenspiel von Selektinen, Integrinen und Chemokinrezeptoren gesteuert. Die Expression dieser Moleküle sowie die Wirkung der aktivierten Signalmoleküle können dabei je nach Zelltyp (Neutrophile versus Lymphozyten, T_H1 - versus T_H2 - Zellen etc.) und Aktivierungsstatus (naiv, aktiviert oder ruhend) verschieden sein. Die Migration der T-Zellen kann entsprechend auch von kostimulatorischen Molekülen beeinflusst werden. Sowohl CD28- als auch CD152-Signale aktivieren GTPasen über G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die ihrerseits die Integrin-vermittelte Adhäsion der T-Zellen induzieren. CD28-Engagement führt *in vitro* zu erhöhter Integrin-vermittelter Adhäsion [225] und zu Zytoskelettlagerungen über die GTPasen Rac1 [226] und Cdc42 [227]. Die Wirkung der CD28-Signale auf die Chemokinrezeptoren ist allerdings nicht eindeutig geklärt. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wurde durch CD28-Signale auf aktivierten und ruhenden murinen $CD4^+$ T-Zellen bei *in vitro* Experimenten verstärkt exprimiert [228]. Auch bei der Aktivierung humaner T-Zellen über CD3/CD28-Signale erhöhte sich die Expression des Rezeptors CXCR4, während die Expression des inflammatorischen Chemokinrezeptors CCR5 durch CD28-Signale gesenkt wurde [229].

Die kostimulatorischen Signale der CD152-Moleküle steigern ebenfalls die Adhäsion der T-Zellen. CD152-aktivierte G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten erhöhen über die GTPase Rap1 die Aktivierung des wichtigsten Integrins für die Leukozytenadhäsion LFA-1 [58]. Die damit verbundene verstärkte Mobilität der T-Zellen wurde als Mechanismus zur Beendigung von Immunreaktionen interpretiert [230]. CD152-Engagement hebt demnach TZR-induzierte Stopp-Signale zum Absuchen der Peptid/MHCII-Komplexen auf und verringert die Kontaktzeiten zur Antigenprägung. Über die Wirkung der CD152-Signale auf Chemokinrezeptoren ist bisher nur

bekannt, dass die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 in humanen CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von CD152-Signalen gesteigert wird [229].

1.7 Zielsetzung

Die Lokalisierung von T-Lymphozyten spielt sowohl für die Ausführung der schützenden adaptiven Immunabwehr als auch bei pathologischen Infiltrationen von Geweben eine entscheidende Rolle, denn T-Zellen können weitere immunreaktive Zellen anlocken und damit die Immunantwort vorantreiben. Unkontrollierte Infiltration von T-Zellen kann zu Autoimmunerkrankungen mit der Schädigung körpereigenen Gewebes führen. Das Verlassen der Blutbahnen und die Einwanderung in Gewebe werden bei Lymphozyten über Chemokine ausgelöst, die mit Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der Lymphozyten interagieren und Adhäsionsmoleküle aktivieren. Die Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der T-Zellen dirigieren die Zellen in spezifische Gewebe z. B. sekundäre lymphatische oder entzündete Gewebe. Die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren auf der Zellmembran ändert sich mit der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen, so dass jede T-Zellsubpopulation eine charakteristische Expression von Chemokinrezeptoren zeigt.

Das kostimulatorische Molekül CD152 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der T-Zellaktivierung. Im Gegensatz zu von CD28-Signalen, die Proliferation und Expansion naiver T-Zellen fördern, führen CD152-Signale zur Beendigung der T-Zell-Effektorphase. Neben der klassischen Sichtweise der CD152-Moleküle als inhibitorisches Element von Immunreaktionen, werden zunehmend positive Regulationen von CD152-Signalen beschrieben. So vermitteln CD152-Signale Schutz vor dem aktivierungsinduzierten Zelltod und erhöhen die Mobilität von T-Zellen über die verstärkte Expression des Integrins LFA-1. Auch die für die Migration notwendige Polarisierung der Zellen mit Ausbildung einer anterior-posterior-Achse wird durch CD152-Signale gefördert. Über eine mögliche Beteiligung von CD152-Signalen an der zielgerichteten, Chemokin-vermittelten Migration ist wenig bekannt. Sie wird durch die gesteigerte Expression des Chemokinrezeptors CCR5 in Anwesenheit von CD152-Signalen in humanen T-Zellen gestützt.

Ziel dieser Arbeit war es, zu ermitteln, ob das CD152-Molekül ein zentraler Faktor ist, der die Sensibilisierung von T-Zellen für die Migration steuert. Insbesondere sollte das Migrationsverhalten inflammatorischer $CD4^+$ T_H1 -Zellen unter dem Einfluss von CD152-Signalen untersucht werden, da dieser Zelltyp oft an der Entwicklung chronischer Krankheitsverläufe und Autoimmunerkrankungen beteiligt ist. Bei einer Beeinflussung der Chemokin-induzierten Migration durch das CD152-Engagement sollte der molekulare Mechanismus der CD152-Signale analysiert werden. Aus der Vielzahl von Signalmolekülen sollten mögliche Kandidaten identifiziert werden, die in T_H1 -Zellen durch CD152-Signale unterschiedlich reguliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Medien und Puffer

Die verwendeten Chemikalien stammen von den angegebenen Herstellern. Zum Ansetzen der Lösungen wurde durch Millipor (Schwalbach) gereinigtes Wasser verwendet.

PBS: (<i>phosphate buffered saline</i>)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 7,9 mM, Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O pH 7,2	Merck Merck Merck Merck
PBS/BSA (<i>bovine serum albumine</i>)	PBS (pH 7,2) 30 mM Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories
PBA/BSA/Azid	PBS/BSA (pH 7,2) 0,05 % NaN ₃	Merck
RPMI	RPMI 10 % FCS (fetal calf serum) 100 U/ml Penizillin 100 U/ml Streptomycin 0,5 mM Gentamycin 50 µM 2-Mercaptoethanol	Gibco Sigma-Aldrich PAA Laboratories PAA Laboratories PAA Laboratories Invitrogen
RPMI 1640, phenolrotfrei		PAN Biotech GmbH
„Assaymedium“	RPMI 1640, phenolrotfrei 0,5 % BSA Fraktion V	Sigma-Aldrich
DMEM	DMEM 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 50 µM 2-Mercaptoethanol	PAA Laboratories Sigma-Aldrich PAA Laboratories PAA Laboratories Invitrogen
Fixierlösung	2 % Paraformaldehyd in PBS	Merck

Saponinpuffer	PBS/BSA 0,5 % Saponin	Sigma-Aldrich
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10 mM KHCO ₃ 155 mM NH ₄ Cl 0,1 mM EDTA pH 7,5	Merck Merck Merck
HBSS	Hank's balanced salt solution, phenolrotfrei	Biochrom AG
2xHBS	50 mM HEPES, pH 7,05 10 mM KCl 12 mM Dextrose 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄	Merck Merck Merck Merck Merck
TAE (1x)	0,04 M Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0	Merck Merck
Laemmlipuffer	60 mM Tris-HCl (pH 6,8) 25 % Glycerol 2 % SDS 14,4 mM β-Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau	Merck Sigma-Aldrich Merck Invitrogen Sigma-Aldrich
TBS	29 mM Tris 137 mM NaCl 3,8 mM HCl pH 7,6	Merck Merck Merck
TBS-T	TBS 0,1 % Tween 20	Merck Sigma-Aldrich
Lysepuffer	50 mM Tris, pH 8,0 1 % NP-40 1 mM PMSF 5 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄	Merck Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich

SDS-Elektrophorese- Laufpuffer	25 mM Tris	Merck
	192 mM Glyzin	Merck
	0,1 % SDS	Merck
	pH 8,3	
Transferpuffer	1,5 M Glyzin	Merck
	25 mM Tris	Merck

Sonstige Reagenzien:

Akt-Inhibitor II, Calbiochem

PI3'K-Inhibitoren: Ly294.002, Wortmannin (Sigma-Aldrich)

Polyacrylamid, Rothphorese 30

Ammoniumpersulfat, Roth

Temed, Sigma-Aldrich

2.2 Antikörper

Die folgenden gegen Antigen der Maus gerichteten Antikörper wurden von den angegebenen Herstellern bezogen oder im DRFZ (Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin) aus Hybridomüberständen über Protein G Säulen gereinigt und mittels Chromatografie (HPLC) aufgereinigt. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die genannten Antikörper als Fluoreszeinisothiocyanat- (FITC), Phycoerythrin- (PE), Peridinin Chlorophyll-a Protein- (PerCP), Cyanin dye 5- (Cy5), Alexa488- bzw. PE-Cy5-Konjugate verwendet. Bei biotinylierten Antikörpern wurde das PE-gekoppelte Sekundärreagenz Streptavidin (BD Pharmingen) eingesetzt. Die verwendeten phospho-spezifischen Antikörper wurden mit Alexa-Fluor® 488 gekoppelten IgG F(ab)₂-Fragmenten (Cell Signaling Technology) detektiert.

Antikörper für die Durchflusszytometrie:

Spezifität	Klon	Hersteller
anti-CD4	GK-1.5	DRFZ
anti-CD62L	MEL-14	DRFZ
anti-CD44	IM7	DRFZ
anti-Thy1	HO-13	DRFZ
anti-CD152	UC10-4F10	DRFZ

Spezifität	Klon	Hersteller
anti-IFN- γ	AN18.17.24	DRFZ
anti-B220	RA3.6B2	DRFZ
anti-MHC-II	M5/114	DRFZ
anti-OVA-TCR	KJ1-26.1	DRFZ
anti-CD69	H1.2F3	BD Pharmingen
anti-CD25	7D4	BD Pharmingen
anti-IL-4	BVD4-1D11	BD Pharmingen
Isotyp für CD25	R4-22	BD Pharmingen
anti-CD4	H129.19	BD Pharmingen
anti-CD86	GL1	BD Pharmingen
anti-CCR5	C34-3448	BD Pharmingen
anti-CXCR4	2B11	BD Pharmingen
anti-CCR7	EBI-1	eBioscience
anti-phospho-ERK1/2	pT202/pY204	BD Phosflow
anti-phospho-Akt	Ser473	Cell Signaling Technology
anti-phospho-Akt	Thr308	Cell Signaling Technology
anti-Akt (pan)	C67E7	Cell Signaling Technology

Antikörper für die Stimulation und Differenzierung von Kulturzellen:

Spezifität	Klon	Hersteller
anti-CD3	145-2C11	DRFZ
anti-CD28	37.51	DRFZ
anti-CD152	UC10-4F10	DRFZ
Isotypkontrolle Hamster	560-31.1B9	DRFZ
anti-CD11c	N418	DRFZ
anti-IL-4	11B11	DRFZ
anti-IFN- γ	AN18.17.24	DRFZ

Antikörper für Westernblotanalysen:

Spezifität	Klon	Hersteller
anti- α -Tubulin	DM1A	Calbiochem
anti-GRK2	Y137	abcam
anti-phospho-GRK2	Phospho S670	abcam

Als sekundäre Antikörper für die Analyse von Proteinen im Westernblot wurden an Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelte anti-Maus-Ig-Antikörper (BD Pharmingen) bzw. anti-Kaninchen-Ig-Antikörper (abcam) aus der Ziege eingesetzt.

2.3 Rekombinante Cytokine und Chemokine

Rekombinantes murines IL12 zur Polarisierung der Zellen, sowie die rekombinanten murinen Chemokine CCL4, CCL19, CXCL12 und CXCL9 wurden von R&D Systems bezogen. Die optimale Konzentration der Chemokine wurde in Chemotaxisversuchen (s. 2.11) durch Titration der Chemokine (0,1 nM - 300 nM) an CD4⁺T-Zellen aus OTII C57BL/6 TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren ermittelt. Die Chemokine wurden nach Titration in optimaler Konzentration in Chemotaxisversuchen eingesetzt (CCL4 10 nM, CCL19 10 nM, CXCL12 20 nM und CXCL9 100 nM).

2.4 Versuchstiere

Es wurden Mäuse der Stämme BALB/c, C57BL/6, T-Zell-Rezeptor transgene (OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid erkennende) DO11.10 BALB/c [231], OTII C57BL/6 (TZR^{tg}CD152^{+/+}, [232]) und CD152-defiziente OTII C57BL/6 (TZR^{tg}CD152^{-/-}) im Alter von 6-12 Wochen verwendet. C57BL/6 CD152-defiziente Tiere (CD152^{-/-}, [233]) wurden aufgrund der frühen Letalität im Alter von 3-5 Wochen verwendet. Alle Stämme wurden unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin gehalten. Die Tierversuche waren unter den Nummern T0098/00 und G0075/02 genehmigt

2.5 Genetische Typisierung

Für die Genotypisierung der transgenen und nicht-transgenen CD152^{-/-} Tiere wurden Schwanzbiopsien der heterozygot verpaarten Tiere genommen und die DNA mit dem Genomic-DNA-Kit II (Invitex) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Folgende Oligomere

(TibMolBiol) wurden als Primer in der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) im angegebenen Programm eingesetzt:

CD152 Oligomere	sense:	5' Tgg AgT CCT TCA TAg TTA gg
	antisense:	5' AAC ATC ACA CTC ACC ATC TTg C
neo Oligomere	sense:	5' CAT AgT Tag gTC TgT gAT gC
	antisense:	5' gCC TTC TAT CgC CTT CTT gAC g

PCR-Programm	95°C	1 Min.	
	95°C	1 Min.	
	62 °C	1 Min.	32 Zyklen
	72°C	1 Min.	
	72 °C	10 Min.	

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel (1,2 % (Invitrogen) in TAE-Puffer) nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch die Zugabe des organischen Farbstoffs Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, konnten die DNA-Fragmente nach Anregung mit UV-Licht in einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Entsprechend ihrer Größe ließen sich die PCR-Produkte homozygoter CD152^{+/+}- (387 bp) und CD152^{-/-} Tiere (687 bp) von heterozygoten CD152^{+/-} Mäusen (687 bp und 387 bp) unterscheiden.

2.6 Herstellung von Fab-Fragmenten

Für die Blockade von CD152-Signalen wurden Fab-Fragmente an Stelle von CD152-Antikörpern verwendet, um eine mögliche Signalvermittlung durch Kreuzvernetzung auszuschließen. Die Fab-Fragmente wurden aus anti-CD152-Antikörpern (UC10-4F10, DRFZ) bzw. Isotypkontrollantikörpern (560-31.1B9) durch Papainverdau nach Angaben des Herstellers (Immuno-Pure Kit Pierce) hergestellt. Die Funktionalität der anti-CD152-Fab-Fragmente wurde an naiven CD4⁺ T-Zellen im Vergleich mit Isotypkontroll-Fab-Fragmenten behandelten Zellen in Proliferationsanalysen (s. Kapitel 2.9.4) und anhand der IFN- γ -Produktion in ELISA (*enzyme-linked immuno-sorbent assay*)-Analysen (DuoSet, R&D Systems) überprüft. Die Inkubation der Zellen mit 200 μ g/ml anti-CD152-Fab-Fragmenten erfolgte 30 Min vor Auslösung der Aktivierung, um eine vollständige Bindung der CD152-Fab-Fragmente zu gewährleisten.

2.7 Isolation primärer Zellen

Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurden Milz, periphere (inguinale und axilläre) und mesenteriale Lymphknoten entnommen und homogenisiert. Alle folgenden Zentrifugationen zum Waschen der Zellen erfolgten bei 300 g für 8 Min. bei 4°C. Erythrozyten wurden aus der Einzelzellsuspension durch Inkubation mit Erythrozyten-Lyse-Puffer beseitigt bevor die Zellen nach einem Waschschrift mit anti-CD4-FITC-Antikörper in einer Oberflächenfärbung (s. Kapitel 2.9.1) markiert wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit paramagnetischen anti-FITC-Partikeln (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers inkubiert und CD4⁺ Zellen über magnetische Zellsortierung (MACS, [234]) angereichert. Die Trennung der positiven und negativen Fraktionen erfolgte am AutoMACS (Miltenyi Biotech) oder manuell über LS-Säulen (Miltenyi Biotech). Für die Gewinnung naiver T-Zellen wurden die Zellen nach Abtrennung der anti-FITC-Multi-Sort-Partikel mit Hilfe von „release“-Reagenz mit anti-CD62L-Partikeln (1:25) inkubiert und positiv angereichert. Die Reinheit der CD4⁺ Zellen wurde durchflusszytometrisch (s. Kapitel 2.9.1) kontrolliert und lag bei 99 %, die der naiven CD62L⁺ Fraktion bei 94-98 %. Kongene Antigen-präsentierende Zellen wurden aus Milzzellen von BALB/c- und C57BL/6 Tieren oder aus der CD4-negativen Fraktion der TZR^{tg}CD152^{+/+} Tiere gewonnen. Nach Inkubation mit anti-CD90-Partikeln und anschließender negativer Selektion waren die CD90-depletierten APZ zu > 95 % rein.

Für die Anreicherung von B-Zellen wurden Milzzellen von BALB/c-Tieren mit anti-CD43-Partikeln behandelt und B-Zellen negativ selektiert. CD43-depletierte Zellen wurden für ihre Aufgabe als APZ durch Zugabe von LPS (von E.Coli, 40 ng/ml, Sigma-Aldrich) für 24 Stunden aktiviert und nach zwei Waschschriften im Verhältnis 4:1 zu den T-Zellen gegeben.

Zur Gewinnung dendritischer Zellen (DZ) wurde das Knochenmark mit einer Spritze aus Femur und Tibia von BALB/c-Mäusen gespült und unter Zugabe von 10 % GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, DRFZ) in RPMI in Petrischalen bei einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml kultiviert. An jedem zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums erneuert und nach 7-9 Tagen wurden die entstandenen DZ von den fest adhärennten Makrophagen durch Abspülen gereinigt. Die Zugabe von TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α , 10 ng/ml, R&D Systems) für 24 Stunden führte zu Reifung der DZ, was über die erhöhte Expression von MHCII, CD80 und CD86 durchflusszytometrisch (s. Kapitel 2.9.1) kontrolliert wurde. Gereifte DZ wurden dreimal in 50 ml PBS/BSA gewaschen, um Reste von TNF- α zu entfernen, und zur Antigenpräsentation im Verhältnis 1:10 mit T-Zellen zusammengesetzt.

2.8 T-Zellaktivierung und Differenzierung zu T_H1-Zellen

2.8.1 Antigen-spezifische Aktivierung

TZR^{tg} CD4⁺ T-Zellen wurden zur Aktivierung mit CD90-depletierten APZ im Verhältnis 1:3 in RPMI 1640 in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml eingesetzt und mit 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml Ovalbumin-Peptid des Huhns (OVA₃₂₃₋₃₃₉, Sequenz: ISQAVHAAHAEINEAGR, Charité, Berlin) aktiviert. Nach 3 Tagen Expansion wurden die Kulturen durch Zugabe von frischem Medium wieder auf eine Zellzahl von ca. 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. 6 Tage nach Beginn der primären Stimulation wurden die Zellen über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) von toten Zellen gereinigt. Dafür wurden 2,5 ml Ficoll mit 5 ml Zellsuspension überschichtet und bei 700 g für 20 Min. bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die lebenden Zellen der Interphase wurden abgenommen, dreimal mit PBS/BSA gewaschen und mit isolierten APZ und mit 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml OVA-Peptid restimuliert.

2.8.2 Polyklonale Aktivierung

Die Aktivierung von T-Zellen aus der Milz von CD152^{-/-} und CD152^{+/+} Tieren erfolgte polyklonal durch die Zugabe des Lektins Concanavalin A (ConA; 1,5 µg/ml, Sigma-Aldrich) oder alternativ durch anti-CD3-Antikörper (2 µg/ml, 145-2C11, DRFZ). Dadurch werden selektiv T-Zellen stimuliert, denn ConA und anti-CD3-Antikörper binden an den TZR:CD3-Komplex und aktivieren die Zellen unabhängig von der TZR-Spezifität. Nach 5 Tagen wurden die toten Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation (s. Kapitel 2.8.1) entfernt und die lebenden Zellen durch Zugabe von isolierten APZ aus kongenen Tieren und ConA bzw. anti-CD3-Antikörpern sekundär aktiviert.

2.8.3 Stimulation durch Mikropartikel mit definierten CD152-Signalen

Für die Untersuchungen mit definierten CD152-Signalen wurden polyklonal aktivierte Zellen von CD152^{+/+} Tieren sekundär durch plattengebundene anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper stimuliert. Dafür wurden 24-Loch-Platten mit je 2 µg/ml Antikörper in 1 ml PBS für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor die Zellen, nach Entfernung der toten Zellen durch Ficollreinigung (s. Kapitel 2.8.1), in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in den Platten kultiviert wurden. Nach 48 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit Antikörper-beschichteten Latexpartikeln (Interfacial Dynamics) zusammengesetzt. Die Latexpartikel waren mit definierten Antikörperkonzentrationen beschichtet. Für die Kopplung wurden 0,25 µg/ml anti-CD3-,

2 µg/ml anti-CD28- und 5,75 µg/ml anti-CD152- bzw. 5,75 µg/ml Kontrollantikörper (N418, alle DRFZ) in PBS mit 1×10^7 Latexpartikeln/ml 1,5 Stunden rotierend bei 37°C inkubiert, mit PBS gewaschen und in 1 ml RPMI-Medium suspendiert. 2×10^5 beschichtete Partikel wurden für die Stimulation von 2×10^5 T-Zellen in 96-Loch-Platten mit rundem Boden eingesetzt.

2.8.4 Differenzierung zu T_H1-Zellen

Für die Entwicklung inflammatorischer T_H1-Zellen wurde die Aktivierung unter T_H1-polarisierenden Bedingungen durchgeführt, d. h. sowohl bei der primären, als auch bei der sekundären Stimulation wurde 10 ng/ml rekombinantes murines Interleukin (IL)-12 (R&D-Systems) und blockierender anti-IL4-Antikörper (6 µg/ml, 11B11, DRFZ) zu den Kulturen gegeben. Die T_H1-Differenzierung wurde in vielen Versuchen durch den Einsatz hoher Antigenkonzentrationen gefördert [235]. Die Differenzierung der T-Zellen wurde routinemäßig durchflusszytometrisch anhand der T_H1-typischen IFN-γ- und T_H2-typischen IL-4-Produktion überprüft (s. Kapitel 2.9.2).

2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene oder der intrazellulären Expression verschiedener Moleküle. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion der Markierung von Zellantigenen mit fluoreszierenden Farbstoffen, die an Antikörper gebunden sind (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS). Die Zellen werden im Durchflusszytometer durch eine Kapillare im Flüssigkeitsstrom vereinzelt und an einem Argonlaser (488 nm) und einem Diodenlaser (635 nm) vorbeigeführt. Vier Fotodetektoren messen die Streuung des Lichtes und die Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe. Das Vorwärtstreulicht (*forward-scattered light*, FSC), das in kleinem Winkel von 3-10° gestreut wird, korreliert mit Größe der Zelle, und das um 90° reflektierte Seitwärtsstreulicht (*side-scattered light*, SSC) gilt als Maß für die Granularität einer Zelle. Die Fluorochrome, die mit Antikörpern konjugiert sind, werden durch die Laser zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Das Emissionsspektrum wird in vier Kanälen (FL-1 bis FL-4) gemessen.

Verwendete Fluorochrome	Anregung bei Wellenlänge	Emission bei Wellenlänge, Detektion in Kanal
FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat)	495 nm	519 nm FL-1
PE (R-Phycoerythrin)	480 nm, 565 nm	578 nm FL-2
PerCP (Peridinin-Chlorophyll-a-Protein)	470 nm	670 nm FL-3
Cychrome	498 nm	670 nm FL-3
Propidiumjodid	536 nm	617 nm FL-3
APC (Allophycocyanin)	650 nm	660 nm FL-4
Cy5 (Indodicarbocyanin)	650 nm	670 nm FL-4

Für die Messungen wurde ein FACS Calibur™ Gerät (BD Bioscience) verwendet und die Auswertung erfolgte mit der CellQuest®- bzw. FlowJo®-Software. Die Zugabe von Propidiumjodid (Sigma-Aldrich), das bei defekten Zellmembranen in Zellen eindringt und in die DNA interkaliert, ermöglichte bei Oberflächenfärbungen den Ausschluss toter Zellen. Bei der Messung wurden mindestens 10.000 Zielzellen (üblicherweise CD4⁺) gespeichert. Lymphozyten wurden durch ihre linearen Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtintensitäten im Zweiparameter-Punktdiagramm (*Dot Plot*) identifiziert. Fluoreszenzsignale wurden in logarithmischer Verstärkung gemessen und durch Negativkontrollen wurden die Bereiche positiver Markierungen festgelegt. Bei der Überlagerung von Histogrammen erlaubt die Darstellung als „Prozent des Maximums“ eine bessere Vergleichbarkeit. Diese Berechnung normiert die Darstellung bei unterschiedlichen Anzahlen durchflusszytometrisch detektierter Ereignisse in verschiedenen Proben auf das gleiche Niveau und wurde in dieser Arbeit verwendet.

2.9.1 Markierung von Oberflächenantigenen

Für die durchflusszytometrische Detektierung von Oberflächenmolekülen wurden zunächst je 1×10^6 Zellen in 50 μl anti-Fc γ -Antikörperlösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 10 Min. inkubiert, um unspezifische Bindungen der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper über die konstante Region an Fc γ -Rezeptoren zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden fluoreszent-gekoppelten Antikörpern in 100 μl PBS/BSA/Azid für 10 Min. auf Eis markiert. Biotin-gekoppelte Antikörper wurden nach einem Waschschrift mit dem Sekundärreagenz Streptavidin-PE für 10 Min. auf Eis inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen entfernt und die Zellen wurden am Durchflusszytometer analysiert (s. Kapitel 2.9). Die Färbung der Chemokinrezeptoren erfolgte nach Angaben der Hersteller für 30 Min. bei 37°C.

2.9.2 PMA/Ionomycin-Stimulation und Markierung intrazellulärer Zytokine

Für die Analyse der Zytokinproduktion wurden 4×10^6 Zellen zunächst für 6 h mit 10 ng/ml des Mitogens Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA, Sigma Aldrich) und 500 ng/ml des Calcium-Ionophors Ionomycin (Sigma Aldrich) stimuliert. Nach 2 Stunden Inkubationszeit wurde Brefeldin A (5 mg/ml, Sigma Aldrich) zur Inhibierung des zellulären Sekretionsapparates zugegeben. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und nach Markierung der Oberflächenantigene (s. Kapitel 2.9.1) für 20 Min. bei RT mit 2 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS/BSA/Azid resuspendiert und maximal 7 Tage bei 8°C aufbewahrt. Für die Markierung intrazellulärer Moleküle wurden die Zellmembranen durch Waschen der Zellen mit Saponinpuffer permeabilisiert. Die Zellen wurden für 10 Min. mit den entsprechenden Antikörpern in Saponinpuffer inkubiert, ungebundene Antikörper durch Waschen mit Saponinpuffer entfernt und die Zellen für die Messungen in PBS/BSA/Azid aufgenommen.

2.9.3 Markierung phosphorylierter Kinasen (Erk und Akt)

5 Tage nach Beginn der sekundären Stimulation wurden 5×10^6 Ficoll-gereinigte Zellen/ml (s. Kapitel 2.8.1) in RPMI (ohne Zusätze) in 24-Lochplatten ausgesät und für 3 Stunden bei 37°C ruhen gelassen, um die Expression bindungsfähiger Chemokinrezeptoren zu fördern. Die Zellen wurden danach für 5 Min. bzw. 20 Min. mit 20 nM CCL4 inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 50 μl 16 % Paraformaldehyd (Merck) in der Platte für 10 Min. bei 37°C fixiert. Die Zellen wurden in eiskaltem PBS abgenommen, gewaschen und mit 90 % Methanol für 30 Min. auf Eis oder bei -20°C über Nacht permeabilisiert. Für die Markierung

wurden die Zellen zweimal in PBS/BSA/Azid gewaschen und je 1×10^6 Zellen/ml wurden mit 50 μ l Antikörperlösungen für Phospho-ERK1/2 bzw. Phospho-Akt (Ser473), Phospho-Akt (Thr308) oder pan-Akt für 60 Min. bei RT inkubiert. Nach Waschen der Proben mit PBS/BSA/Azid wurde der sekundäre Antikörper, Ziege-anti-Kaninchen IgG Alexa-Fluor 488 F(ab)₂-Antikörper, für 30 Min. bei RT zugegeben. Die Zellen wurden erneut gewaschen, mit Fluorochrom-gekoppelten CD4-Antikörpern für 10 Min. auf Eis markiert und im Durchflusszytometer analysiert.

2.9.4 Markierung zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Proliferation

Für die Proliferationsanalyse von T-Zellen wurde Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester (CFDA-SE, Molecular Probes) verwendet. Die Diazetat-Form ist ein ungiftiges, nicht fluoreszentes, membrangängiges Molekül. Esterasen im Inneren lebender Zellen spalten Azetylgruppen des Moleküls ab und wandeln CFDA-SE in das fluoreszente CFSE-Molekül um. Die Succinimidylgruppe des Moleküls bindet kovalent an freie Aminogruppen zellulärer Proteine, wodurch das Fluorochrom bei Zellteilungen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Entsprechend nimmt die Fluoreszenzintensität mit jeder Teilung ab und ermöglicht die durchflusszytometrische Bestimmung der Generationenanzahl.

Für die Markierung von T-zellen mit CFSE wurden naive CD4⁺ T-Zellen mit PBS gewaschen und in der Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in 5 μ M CFDA-SE in PBS für 4 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen, in RPMI-Medium aufgenommen und kultiviert (s. Kapitel 2.8.1). Nach 3-5 Tagen wurden die Zellen abgenommen, CD4-Moleküle auf der Oberfläche markiert (s. Kapitel 2.9.1) und die CFSE-Markierung im Durchflusszytometer gemessen.

2.10 Retrovirale Transduktion

Für die Rekonstitution von CD152-Molekülen in CD152-defizienten Zellen wurde die retrovirale Transduktion angewendet. Dabei werden zunächst Retroviren durch transiente Transfektion von 293T Zellen mit dem retroviralen Expressionsplasmid zusammen mit den Vektoren für die Verpackungsgene pCGP und pECO (Prof. Kenneth Murphy, Washington University, St. Louis, USA) hergestellt. Anschließend wurden primäre Zellen mit diesen CD152-enthaltenden Retroviren transduziert. Der Expressionsvektor pMSCV-CD152 enthält LTR (*long terminal repeats*), die die Expression des Reportergens GFP und der cDNA von CD152 initiieren. Ein IRES (*Internal ribosomal entry site*)-Element trennt die DNA von CD152 und GFP, wodurch eine bi-cistronische mRNA und daraus zwei Proteine hergestellt werden.

Für die Transfektion wurden 20 µg Expressionsplasmid pMSCV-CD152 bzw. der Vektor pMSCV, mit je 10 µg der Verpackungsvektoren pCGP und pECO in 1,5 ml ddH₂O und 400 µl 1,25 M CaCl₂ gelöst und durch tropfenweise Zugabe von 2 ml HBS präzipitiert. Die Lösung mit den Calcium-Phosphat-Präzipitaten wurde zu $1,2 \times 10^7$ 293T Zellen in DMEM in 15 cm-Kulturschalen (Greiner Bio-one) gegeben und 4 Stunden bei 37°C inkubiert bevor das Medium durch RPMI ersetzt wurde. Nach 48 Stunden wurde der virushaltige Überstand der 293T Zellen abgenommen, filtriert (45 µm) und mit 10 mM Polybrene (Sigma-Aldrich) und 1 mM HEPES versetzt. Damit wurden für 48 Stunden polyklonal mit anti-CD3-Antikörpern stimulierte Milzzellen aus CD152-defizienten Tieren suspendiert (4×10^6 Zellen/ml) und durch Zentrifugation in 6-Loch-Kulturplatten bei 700 g für 90 Min. bei 25°C transduziert. Anschließend wurden die Zellen in konditioniertem Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung kultiviert. Erfolgreich transduzierte Zellen konnten anhand der GFP-Eigenfluoreszenz durchflusszytometrisch detektiert werden.

2.11 Chemotaxisversuche

Für *in vitro* Transmigrationsversuche wurden stimulierte Zellen nach dem Entfernen der toten Zellen durch Dichtezentrifugation (s. Kapitel 2.8.1) und nachfolgenden Waschschritten bei RT in 5×10^6 Zellen/ml Assaymedium suspendiert und für 2 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ ruhen gelassen.

Durchgeführt wurden die Experimente in 24-Loch Transwell®-Systemen (Corning B.V.) bei denen Einsätze mit Polycarbonatmembranen und 5 µm Poren eine obere Kammer von einer unteren Kammer trennen. Die Membranen wurden zunächst mit je 50 µl Fibronectin (10 µg/ml ddH₂O, Sigma) für 1 Stunde bei 37°C beschichtet. Die Flüssigkeit wurde entfernt und die Platten wurden für 2 Stunden bei 30°C getrocknet. In die unteren Kammern wurden 600 µl Medium bzw. Chemokinlösungen (10 nM, CCL4, 10 nM CCL19, 20 nM CXCL4 oder 100 nM CXCL9) gegeben und in die oberen Kammern wurden je 100 µl der Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml) pipettiert. Nach 90 Min. Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ wurden 500 µl der unteren Kammern abgenommen und mit 10 µl fluoreszenten Mikropartikeln (1:2 in PBS, fluoresbrite™ YG microspheres 20 µ, Polysciences) und 1 µl CD4-Cychrome (BD Pharmingen) versetzt. Ohne Waschschrritte wurden am Durchflusszytometer die Anzahl der Mikropartikel, die durch starke Fluoreszenzintensität in verschiedenen Kanälen des Durchflusszytometers eindeutig zu identifizieren sind, und die CD4⁺ Zellzahl ermittelt (Abb. 4). Es wurden mindestens fluoreszente 4000 Mikropartikel oder 3000 CD4⁺ Zellen aufgenommen. Die genormte Anzahl der Mikropartikel in allen Versuchsansätzen ermöglicht es, die Zellzahlen der einzelnen Ansätze zu vergleichen.

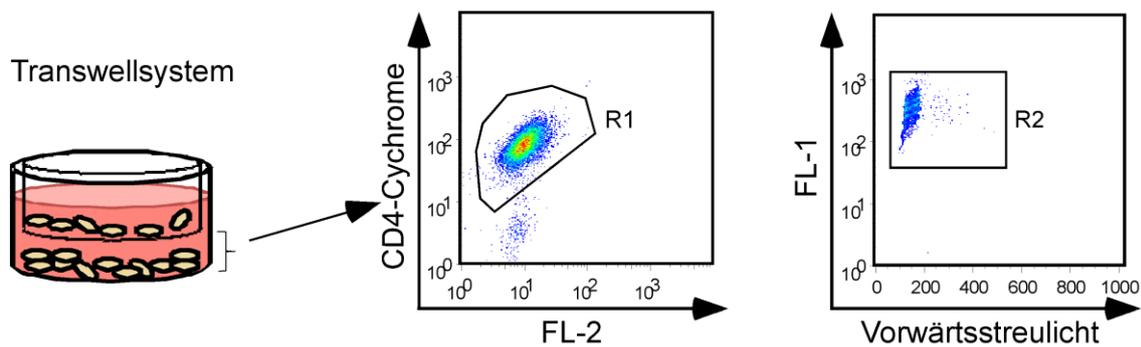


Abb. 4: **Quantifizierung einer Zellprobe mit Hilfe von Mikropartikeln und CD4-Markierung im Durchflusszytometer.** Nach 5 Tagen sekundärer Stimulation wurden lebende Zellen nach Dichtezentrifugation in Chemotaxisversuche eingesetzt. Aus den unteren Kammern des Transwellsystems (links) wurden die Zellen abgenommen, mit einer genormten Anzahl fluoreszenter Mikropartikel versetzt und mit fluoreszenten CD4-Antikörpern markiert. CD4⁺ T-Zellen waren in der Region 1 (R1) durch die Markierung eindeutig von CD4⁻ APZ zu trennen. (Mitte). Zugesezte Mikropartikel sind aufgrund ihrer starken Fluoreszenzintensität klar abgegrenzt in R2 messbar (rechts). Die Anzahl der CD4⁺ Zellen in R1 in verschiedenen Proben kann durch die genormte Mikropartikelmenge in allen Versuchsansätzen berechnet werden. FL, Fluoreszenzkanal

Der chemotaktische Index definiert das Verhältnis der CD4⁺ T-Zellen, die gerichtet zu einer Chemokinlösung migrieren, zu spontaner Basismigration der CD4⁺ T-Zellen zu Medium und errechnet sich aus:

$$\text{Chemotaktischer Index} = \frac{\text{Anzahl CD4}^+ \text{ T-Zellen in Chemokinlösung}}{\text{Anzahl CD4}^+ \text{ T-Zellen in Medium}}$$

2.12 Generierung einer einlagigen Endothelzellschicht auf Transwellmembranen

Für die Untersuchung der Migration durch eine Endothelschicht wurden 5×10^4 mIEND1-Zellen (*murine mesenteric lymph node derived endothelial cell line*; Prof. Dr. Rupert Hallmann, University Hospital, Lund) in 200 μ l RPMI-Medium auf Fibronectin-beschichteten Transwell-Membranen (s. Kapitel 2.11) ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Wachstum der Zellen zu einer durchgängigen Einzelzellschicht wurde mikroskopisch kontrolliert. Vor Zugabe der T_H1-Zellen wurde das Medium entfernt und der Migrationsversuch wie oben beschrieben durchgeführt (s. Kapitel 2.11). Um im Mikroskop das konfluente Wachstum der Endothelzellen nachzuweisen, wurden die Zellen auf den Membranen der Kammereinsätze mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 90 μ l Formaldehyd (37 %) in die unteren Kammern bei RT fixiert. Die Kammereinsätze wurden in neue Platten gesetzt und 5 %

GIEMSA-Lösung (Merck) wurde zugegeben. Die Azur-Eosin-Methylenblaulösung färbt Zellkerne der Membran-gebundenen Zellen violett und deren Zytoplasma rosa an. Nach 30 Min. Inkubation bei RT wurde die Farblösung abgenommen. Die Membranen wurden über Nacht getrocknet, von den Kammereinsätzen getrennt und für die Analyse am Mikroskop (Axioplan, Zeiss) auf Objektträgern in Entellan[®] (Merck) eingebettet.

2.13 Untersuchung der Migration *in vivo*

2.13.1 Organspezifische Akkumulation von T_H1-Zellen nach adoptivem Transfer

In sogenannten "homing assays" wird die Migration adoptiv transferierter Zellen zu verschiedenen Organen von Empfängertieren *in vivo* untersucht. CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{+/+} und TZR^{tg}CD152^{-/-} Tieren wurden *in vitro* zu T_H1-Zellen polarisiert (s. Kapitel 2.8.) und nach 6 Tagen sekundärer Stimulation mit dem radioaktiven Isotop Chrom-51 markiert. Dafür wurden 2x10⁷ Zellen/ml für 1 Stunde mit 20 µCi (0,74 MBq/ml) Chrom-51 (Hartmann Analytic) bei 37°C inkubiert. Chrom-51 dringt nach Anheftung an Serumproteine in die Zellen ein und bindet an intrazelluläre Peptide. Diese homogene radioaktive Markierung bleibt für 1-2 Tage stabil. Ungebundene Radioaktivität wurde durch 2-3-maliges Waschen bei RT mit Medium entfernt und anschließend wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C ruhen gelassen. Nach einem anfänglichen Verlust der Radioaktivität von ca. 20 % in der ersten Stunde nach der Markierung sinkt die Radioaktivität in lebenden Zellen langsam um ca. 1 % pro Stunde, was dem Metabolismus zellulärer Proteine entspricht. Abgestorbene Zellen wurden durch Dichtezentrifugation (s. Kapitel 2.8.1) entfernt. Nach zwei Waschschritten bei RT wurden die Zellen in HBSS in einer Konzentration von 5x10⁶Zellen/ml aufgenommen und 200 µl Zellsuspension wurden in die Schwanzvenen kongener Empfängertiere (C57Bl/6) injiziert (= 1x10⁶Zellen/Tier). 24 Stunden nach dem Zelltransfer wurden die Mäuse durch Kohlendioxid-Begasung getötet und sofort ca. 500 µl Blut aus dem Herzen entnommen. Das Blut wurde nach der Erythrozytenlyse (s. Kapitel 2.7) zentrifugiert, das Serum wurde von peripheren Blutleukozyten (PBL) abgenommen und getrennt analysiert. Die Organe Leber, Lunge, Milz, Darm, Haut, periphere (axilläre, inguinale und popliteale) und mesenteriale Lymphknoten wurden entnommen und separat vom restlichen Körper (unter Ausschluss des Schwanzes) mit einem γ-Strahlendetektor (gammaCounter, Packard, Wallac) auf vorhandene Radioaktivität untersucht. Es wurden 2000 Sekunden oder 2500 radioaktive Ereignisse (*counts*) gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Excel und GraphPadPrism, wobei die in den Organen wieder gewonnene Radioaktivität auf die Gesamtradioaktivität (100 %) pro Tier bezogen wurde.

2.13.2 *In vivo* Migration im Entzündungsmodell

Als Modell für eine T-Zell-gesteuerte Infektion mit Einwanderung der Zellen in entzündetes Gewebe dient die Auslösung einer DTH-Reaktion (*delayed type hypersensitivity*). Wie in Kapitel 2.13.1 beschrieben, wurden polarisierte CD4⁺ T_H1-Zellen von ^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren fünf Tagen nach Beginn der sekundären Stimulation radioaktiv markiert und in C57BL/6-Tiere injiziert. 24 Stunden später wurde eine DTH-Reaktion ausgelöst, indem 250 µg OVA-Peptid in 10 µl IFA (*Incomplete Freund's Adjuvants*, Pierce, USA) in den linken Fußballen des Tieres subkutan injiziert wurde, der rechte Fuß wurde als Kontrolle mit PBS/IFA behandelt. Die IFA-Lösungen wurden mit einem Sonicator (Sonoplus, Bandelin electronic, Berlin) direkt vor der Injektion homogenisiert. 48 Stunden nach dem Transfer, entsprechend 24 Stunden nach Auslösung der DTH, wurden die Organe und Körperteile entnommen. Zusätzlich zu den oben erwähnten Organen des „*homing assays*“ (s. Kapitel 2.13.1) wurden die ableitenden Lymphknoten (popliteale und inguinale) der Entzündungs- bzw. Kontrollseite und die Füße, mit und ohne Entzündung, auf Radioaktivität und damit auf eingewanderte Zellen separat analysiert. Die Fußschwellung wurde vor und 24 Stunden nach der Injektion mit Hilfe eines Außentasters (Oditest, Kroeplin) am Ballen unterhalb der Zehen gemessen.

2.14 Gelelektrophorese und Westernblot

Je 5x10⁶ Zellen wurden nach fünf Tagen sekundärer Stimulation für zwei Stunden in Assaymedium ruhen gelassen und dann für 5 bzw. 20 Minuten mit Chemokin stimuliert. Nach Waschen in eiskaltem PBS wurden die Zellen in 100 µl Lysepuffer 30 Min. auf Eis inkubiert. 20 µl des Lysats wurde nach Zugabe von reduzierendem 5x Laemmli-puffer bei 95°C denaturiert und auf einem 12,5 %-igen Polyacrylamidgel bei 60 mA in einer Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad) in SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Zur Identifizierung der Proteingröße wurde ein Größenstandard (Bio-Rad) aufgetragen. Die Proteine wurden in kaltem Transferpuffer in einer „*Wet-Blot*“-Kammer (Bio-Rad) bei 100 V eine Stunde auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 85, Schleicher und Schuell) übertragen. Die Membran wurde in 5 % BSA in TBS-T für 2 Stunden bei RT bzw. 16 Stunden bei 4°C inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit anti-phospho-GRK2 Antikörper über Nacht bei 8°C bzw. mit anti-GRK2 oder anti-α-Tubulin-Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert, gewaschen und mit sekundären, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpern für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden das ECLTM-System und Hyperfilme ECL (Amersham Biotech) zur Detektion verwendet.

2.15 Grafische Darstellung und Statistik

Die Auswertung der *in vitro* Migrationsversuche erfolgte mit dem Programm Excel, dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung. Zur Bestimmung von Signifikanzen wurde der zweiseitige *Student's t*-Test verwendet. *In vivo* Daten wurden mit den Programmen Excel und GraphPadPrism ausgewertet und statistische Analysen erfolgten mit dem *Mann-Whitney-U*-Test. P-Werte mit $p < 0,05$ wurden als signifikant (*) angesehen, $p < 0,01$ (**) galt als hoch signifikant und $p < 0,001$ (***) als höchstsignifikant.

3 Ergebnisse

Die Lokalisierung von T-Zellen in lymphatischen Organen und infizierten Geweben ist für die Ausführung adaptiver Immunantworten von zentraler Bedeutung. Die zielgerichtete T-Zellbewegung wird von Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktionen bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Migrationsverhalten von CD4⁺ T-Zellen unter dem Einfluss von kostimulatorischen CD152-Signalen untersucht. Zunächst wurde die gerichtete Migration von CD4⁺ T-Zellen mit und ohne CD152-Signale zu Gradienten von homöostatischen und induzierbaren Chemokinen in Transwell-Systemen *in vitro* analysiert. Der Mechanismus der CD152-vermittelten Chemotaxis wurde durchflusszytometrisch, in Westernblot-Analysen und funktionellen Migrationsversuchen untersucht und konnte auf GRK-2-vermittelte Prozesse und PI3K-abhängige Akt-Aktivierung zurückgeführt werden. Die Relevanz der CD152-vermittelten Migration von T_H1-Zellen wurde mit adoptiven Transferexperimenten *in vivo* bestätigt.

3.1 CD152-Signale beeinflussen die Migration von CD4⁺ T-Zellen *in vitro*

Erste Versuche zur Untersuchung des Einflusses von CD152-Signalen auf das Migrationsverhalten von T-Zellen wurden mit unpolarisierten CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren durchgeführt. Die Zellen wurden Antigen-spezifisch durch Zugabe von OVA-Peptid und CD90-depletierten APZ für sechs Tage stimuliert. Lebende Zellen wurden durch erneute Gabe von OVA-Peptid und CD90-depletierten APZ restimuliert und sechs Tage nach Beginn der sekundären Stimulation bei *in vitro* Migrationsversuchen eingesetzt. Untersucht wurde die Fähigkeit der CD4⁺ T-Zellen, zu den homöostatischen Chemokinen CCL19 und CXCL4 zu wandern. Diese binden die entsprechenden Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 der T-Zellen. Die Basismigration gibt die Anzahl der Zellen wieder, die in den Mediumkontrollen ohne Zusatz von Chemokinen detektiert wurde, und reflektiert die ungerichtete Mobilität von Zellen. Sie lag nach 90-minütiger Inkubation der CD152-kompetenten bzw. CD152-defizienten TZR^{tg} T-Zellen im Transwell-System bei beiden Zellpopulationen bei 6 %. Zu den Chemokingradienten von CXCL12 und CCL19, die in optimalen Konzentrationen eingesetzt wurden, migrierten entsprechend 35 % bzw. 15 % der CD152-defizienten CD4⁺ T-Zellen, während 72 % bzw. 80 % der CD152-kompetenten T-Zellen durch die Membran des Transwell-Systems zu den Chemokinlösungen wanderten (Abb. 5).

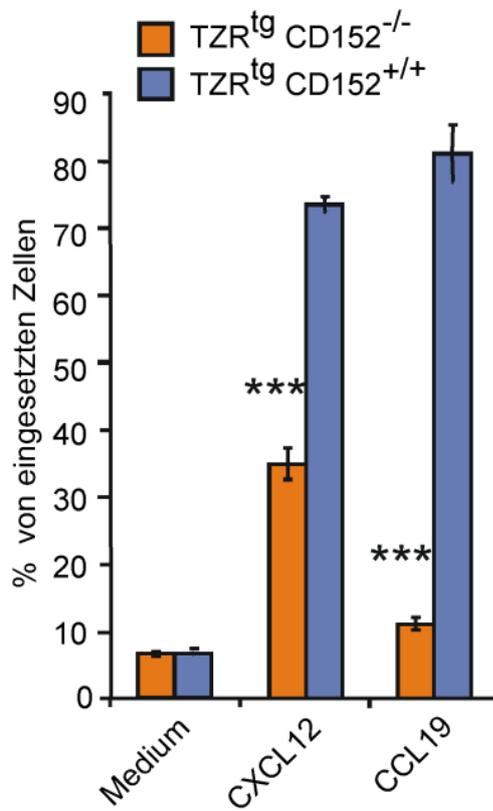


Abb. 5: Migration unpolarisierter CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{+/+} und TZR^{tg}CD152^{-/-} Mäusen wurden Antigen-spezifisch mit 1 µg/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ primär und sekundär stimuliert. Nach 6 Tagen Sekundärstimulation wurden die Zellen durch Dichtezentrifugation von toten Zellen gereinigt und für *in vitro* Chemotaxis-Versuche verwendet. 5x10⁵ Zellen wurden in die oberen Kammern des Transwell-Systems gegeben, während den unteren Kammern Medium, 20 nM CXCL12 oder 10 nM CCL19 zugesetzt wurden. Nach 90 Min. Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellsuspensionen der unteren Kammern mit den migrierten Zellen abgenommen. Nach Zugabe von fluoreszenten Mikropartikeln und anti-CD4-Antikörpern wurden Zellen und Mikropartikel durchflusszytometrisch detektiert. Die statistische Auswertung zeigt den Prozentsatz der migrierten CD4⁺ T-Zellen aus den unteren Kammern von den ursprünglich eingesetzten Zellen (100 %) und ist als Mittelwert mit Standardabweichung der gemessenen Triplikate dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2 Die chemotaktische Migration von CD4⁺ T_H1-Zellen ist *in vitro* ohne CD152-Engagement reduziert

Um zu zeigen, dass CD152-Signale auch die Migration proinflammatorischer T_H1-Zellen regulieren können, die für die Pathogenese organspezifischer Autoimmunerkrankungen bedeutsam sind, wurden die T-Zellen in den folgenden Versuchen durch Zugabe von rekombinanten Zytokinen und blockierenden Antikörpern zu T_H1-Zellen differenziert. Die Rolle von CD152-Signalen auf das Migrationsverhalten proinflammatorischer T_H1-Zellen wurde anhand des T_H1-assoziierten Chemokinrezeptors CCR5, aber auch anhand des konstitutiv exprimierten und zusätzlich induzierbaren Chemokinrezeptors CXCR4 untersucht [236].

TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T-Zellen wurden unter T_H1-Konditionen stimuliert. Sechs Tage nach Beginn der primären Stimulation wurde ihre Chemotaxis zu den Chemokinen CCL19 und CXCL12 sowie CCL4, das selektiv an den Chemokinrezeptor CCR5 bindet, analysiert. Unter diesen Bedingungen war die gerichtete Migration zu den homöostatischen Chemokinen CCL19 und CXCL12 von CD152-kompetenten Zellen nur leicht

erhöht gegenüber CD152-defizienten Zellen, während sich bei CCL4 eine signifikante Steigerung des chemotaktischen Indizes bei den CD152-kompetenten Zellen gegenüber CD152-defizienten Zellen zeigte. Der chemotaktische Index gibt die Rate der zu Chemokinlösung gewanderten Zellen im Verhältnis zur Basismigration der Zellen zu Medium an (Abb. 6 A) (CD152^{+/+} Index 7,1; CD152^{-/-} Index 4,4).

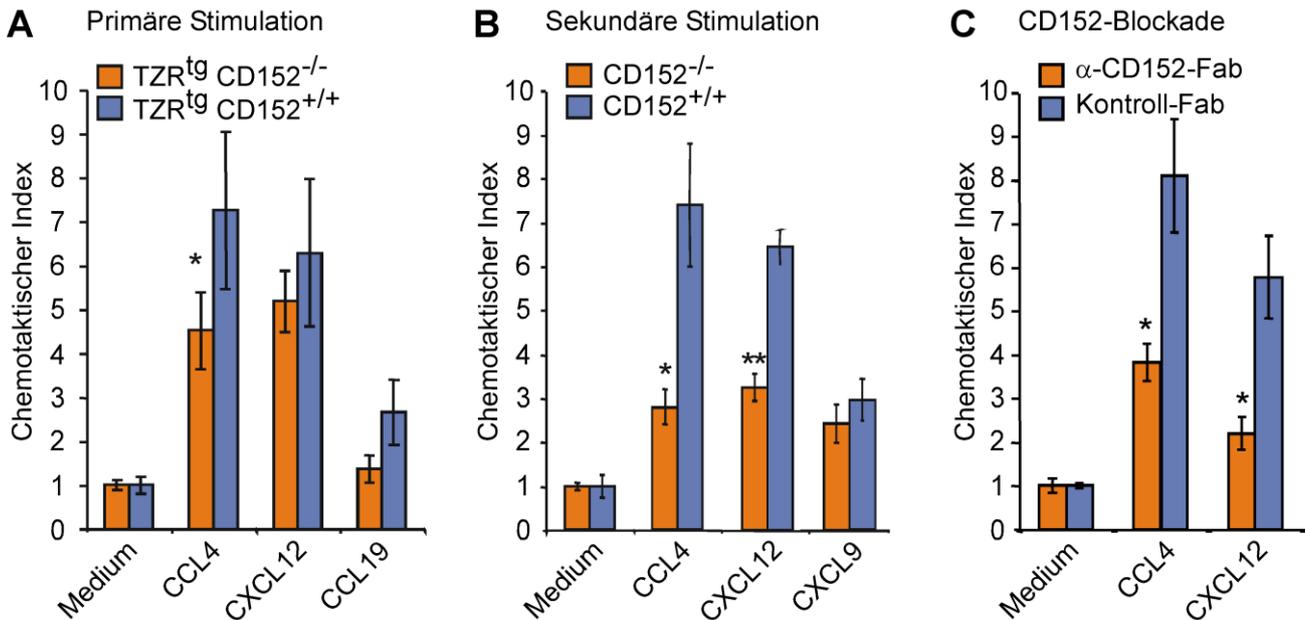


Abb. 6: CD152-Signale erhöhen die gerichtete Migration von inflammatorischen T_H1-Zellen. A, B, C Die statistische Auswertung der CD4⁺ T-Zell-Migration ist als chemotaktischer Index dargestellt und gibt das Verhältnis Chemokin-gerichteten zur Basismigration (Medium) der Zellen wieder. **A Migration von CD4⁺ T_H1-Zellen nach primärer Stimulation.** CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 1 µg/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1-polarisierenden Bedingungen stimuliert. Nach 6 Tagen primärer Stimulation wurden lebende Zellen bei *in vitro* Chemotaxis-Versuchen analysiert (vergl. Abb. 5). **B Migration von CD4⁺ T_H1-Zellen nach sekundärer Stimulation.** Milzzellen aus CD152^{-/-} und CD152^{+/+} Tieren wurden primär polyklonal mit anti-CD3-Antikörpern unter T_H1-polarisierenden Bedingungen stimuliert. An Tag 5 erfolgte die sekundäre Stimulation unter Zugabe von anti-CD3-Antikörpern und kongenen T-Zell-depletierten APZ. Nach 4 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen auf ihre chemotaktischen Fähigkeiten zu 10 nM CCL4, 20 nM CXCL12 und 100 nM CXCL9 untersucht. **C Migration von CD4⁺ T_H1-Zellen nach Blockade von CD152-Signalen.** Naive CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden mit neutralisierenden anti-CD152-Fab-Fragmenten bzw. Hamster-Kontroll-Fab-Fragmenten (200 µg/ml) 30 Min. inkubiert, bevor sie unter T_H1-Bedingungen mit T-Zell-depletierten APZ und OVA-Peptid (1 µg/ml) primär und sekundär stimuliert wurden. Nach 6 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen bei *in vitro* Chemotaxisversuchen analysiert. Die statistische Auswertung zeigt die Mittelwerte aus Triplikaten (+/- Standardabweichung) repräsentativer Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

In der sekundären Stimulation zeigte sich der positive Einfluss von CD152-Signalen auf die Migration der T_H1 -Zellen verstärkt (Abb. 6 B). $CD4^+$ T_H1 -Zellen von $CD152^{-/-}$ und $CD152^{+/+}$ Tieren, die polyklonal mit anti-CD3-Antikörper unter T_H1 -Bedingungen stimuliert worden waren, wiesen nach der zweiten Stimulation deutliche Unterschiede im chemotaktischen Index gegenüber CCL4 und CXCL12 auf. Während die Anzahl CD152-defizienter Zellen in den Chemokinlösungen mit CCL4 und CXCL12 nur 2,8-fach bzw. 3,3-fach höher als die Basismigration war, migrierten 7,4-fach bzw. 6,5-fach mehr CD152-kompetente Zellen zu diesen Chemokinen als zu Medium (Abb. 6 B). Das entspricht einer 2- bzw. 2,6-fachen Erhöhung der Migration zu CXCL12 bzw. CCL4 in Anwesenheit von CD152-Signalen. Zu den Lösungen des inflammatorischen Chemokins CXCL9 gelangten gegenüber der Basismigration 2,3-fach mehr CD152-defiziente Zellen bzw. 2,9-fach mehr CD152-kompetente Zellen (Abb. 6 B). Die Migration zu diesem Chemokin, das mit dem T_H1 -assoziierten Rezeptor CXCR3 interagiert, zeigte sich unabhängig von der CD152-Expression. Die Ursache der niedrigen Migrationsrate könnte in der Kinetik der CXCR3-Expression liegen, denn CXCR3 wird von aktivierten T_H1 -Zellen exprimiert, nicht aber von ruhenden T_H1 -Zellen am Ende der Aktivierungsphase.

Um auszuschließen, dass das veränderte Migrationsverhalten der T-Zellen aus genetisch CD152-defizienten Tieren in den vorangegangenen Versuchen auf anderen Faktoren beruhte, als auf der genetischen Veränderung der CD152-kodierenden DNA, wurde die Chemotaxis jeweils mit und ohne serologische Blockade von CD152-Signalen untersucht. Zur Vermeidung einer möglichen agonistischen Wirkung des Antikörpers, wie sie für *in vitro* Kulturen beschrieben wurde [237], wurden Fab-Fragmente verwendet. Die Funktionalität der Fab-Fragmente wurde anhand der gesteigerter Proliferation und erhöhten IFN- γ -Zytokinproduktion unter CD152-Blockade nachgewiesen (ohne Abb.).

Naive $CD4^+CD62L^+TZR^gCD152^{+/+}$ T-Zellen wurden unter T_H1 -Bedingungen mit APZ in Anwesenheit von anti-CD152-Fab-Fragmenten bzw. Kontroll-Fab-Fragmenten Antigen-spezifisch mit OVA-Peptid primär und sekundär stimuliert. Da die Bindungseffizienz von Fab-Fragmenten 10-fach geringer ist als die des Antikörpers [238], wurden die Fab-Fragmente mit einer hohen Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Nach sechs Tagen sekundärer Stimulation wurde die Migrationsfähigkeit der $CD4^+$ T-Zellen mit und ohne CD152-Blockade in Transwell-Systemen untersucht. Die ursprünglich gleichen Ausgangszellen zeigten unter der Verhinderung von CD152-Signalen eine signifikant reduzierte gerichtete Migration (Abb. 6 C): nur 3,8- bzw. 2,2-fach mehr $CD4^+$ T-Zellen gelangten zu den CCL4- bzw. CXCL12-Chemokinlösungen von als zu Mediumkontrollen. Die Anzahl der Zellen, die mit Kontroll-Fab-

Fragmenten behandelt wurden und über unveränderte CD152-Signale verfügen, war in den Kammern mit CCL4- bzw. CXCL12-Chemokingradienten gegenüber Mediumkontrollen 8,1- bzw. 5,8-fach erhöht (Abb. 6 C).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass kostimulatorische CD152-Signale in der Lage sind, die gerichtete Migration von T_H-Zellen zu homöostatischen und inflammatorischen Chemokinen positiv zu verändern. Der Effekt tritt bei Antigen-erfahrenen T-Zellen der sekundären Stimulation verstärkt auf.

3.3 Definierte CD152-Signale erhöhen die gerichtete Migration von T_H1-Zellen

In den vorangegangenen Versuchen wurden CD152-Signale genetisch oder serologisch inaktiviert. Durch das Fehlen dieses Bindungspartners könnten die CD80- und CD86-Moleküle der APZ vermehrt an CD28-Proteine binden und deren Signale verstärken. Es sollte ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte Anzahl Liganden-gebundener CD28-Proteine anstelle der verhinderten CD152-Signale für den Effekt auf die Migration verantwortlich ist. Deshalb wurde ein Versuchsansatz gewählt, bei dem definierte CD152-Signale an die T_H1-Zellen gegeben und deren Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht wurde. Dafür wurden T_H1-Zellen über Latexpartikel stimuliert. Diese waren mit definierten Mengen von Antikörpern beschichtet, die spezifisch an CD3-, CD28- bzw. CD152-Moleküle binden. Dadurch wurde die direkte Kreuzvernetzung von CD152-Molekülen und damit die Signalinduktion bei konstantem CD28-Signal ermöglicht.

Naive CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen von TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden Antigen-spezifisch mit OVA-Peptid und CD90-depletierten APZ unter T_H1-Bedingungen aktiviert. Nach der sekundären Stimulation der Zellen über 48 Stunden mit plattengebundenen anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern wurden die T-Zellen entweder mit anti-CD3/anti-CD28/anti-IgG- oder mit anti-CD3/anti-CD28/anti-CD152-beschichteten Latexpartikeln für weitere 24 Stunden inkubiert und anschließend in Chemotaxisversuchen analysiert. Die Auslösung der CD152-Signale durch die Zugabe der beschichteten Latexpartikel erfolgte am zweiten Tag nach Aktivierung, da zu diesem Zeitpunkt die Expression von CD152-Molekülen auf der Oberfläche von T_H1-Zellen, sowohl während der primären als auch während der sekundären Stimulation, maximal ist [24,48].

CD4⁺ T-Zellen, die kein CD152-Signal durch die Antikörper-beschichteten Latexpartikel erhalten hatten, zeigten eine 3,5-fach höhere Migrationsrate zu dem inflammatorischen Chemokin CCL4 als zu Medium. Dagegen wanderte die 14,3-fache Anzahl der Zellen mit

CD152-Signal zu diesem Chemokin im Vergleich mit der Mediumkontrolle (Abb. 7 A). Eine gesteigerte Migration konnte auch für die T_H1-Zellen, die mit anti-CD3/anti-CD28/anti-CD152-Latexpartikeln aktiviert worden waren, im Gegensatz zu den T-Zellen, die ohne CD152-Signal

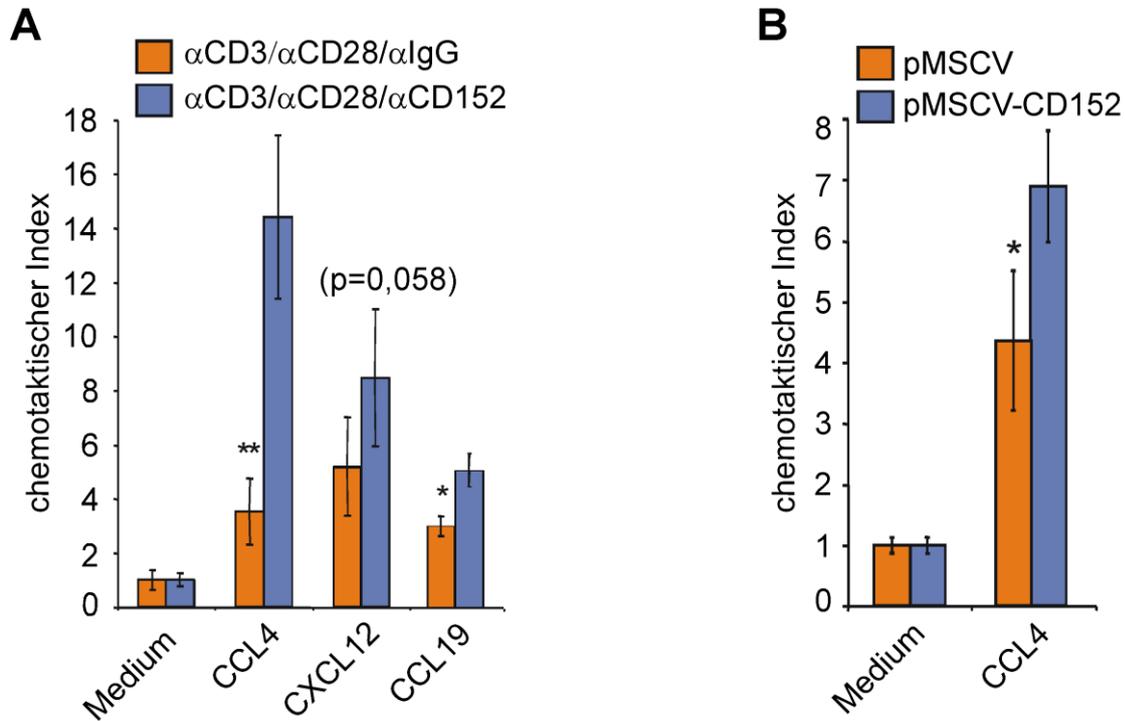


Abb. 7: CD152-Signale erhöhen die gerichtete Migration von T_H1-Zellen. **A, B** zeigen die statistische Auswertung als chemotaktischen Index (Mittelwert der Triplikate +/- Standardabweichung) der lebenden CD4⁺ T-Zellen, die zu den angegebenen Chemokinen migriert sind. **A Migration von T_H1 Zellen nach Gabe definierter CD152-Signale.** Naive CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden mit 1 μ g/ml OVA-Peptid unter T_H1-Bedingungen aktiviert. Die sekundäre Stimulation erfolgte durch Kulturschalen-gebundene anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper (je 2 μ g/ml) für 48 h mit T_H1-polarisierenden Zusätzen. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörper-beschichteten Latexpartikeln (jeweils 0,25 μ g/ml, 2 μ g/ml, 5,75 μ g/ml anti-CD3/anti-CD28/Hamster-IgG bzw. anti-CD3/anti-CD28/anti-CD152) für weitere 24 h inkubiert und die Migrationsfähigkeit der CD4⁺ T-Zellen wurde in Chemotaxisversuchen untersucht (vergl. Abb. 5). **B Migration von CD4⁺ T_H1-Zellen aus CD152-defizienten Tieren nach Rekonstitution von CD152.** Milzzellen von CD152^{-/-} Tieren wurden mit 2 μ g/ml anti-CD3-Antikörper unter T_H1-Bedingungen polyklonal aktiviert und nach 48 h mit Plasmiden, die die cDNA von CD152 (pMSCV-CD152) enthalten bzw. dem Kontrollvektor (pMSCV), retroviral transduziert. Dafür wurden zuvor Fibroblasten mittels Calciumphosphatpräzipitation mit den Vektoren transfiziert und die aktivierten T-Zellen mit dem Virus-haltigen Überstand durch Zentrifugation transduziert. 4 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen sekundär mit anti-CD3-Antikörper und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1-Bedingungen stimuliert und am 4. Tag der sekundären Stimulation in Chemotaxisversuchen analysiert (vergl. Abb. 5). Im Diagramm ist der chemotaktische Index der CD4⁺ transduzierten (GFP⁺) Zellen dargestellt. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

weiterstimuliert worden waren, bei der gerichteten Migration zu den homöostatischen Chemokinen CXCL12 und CCL19 detektiert werden. Die Unterschiede der chemotaktischen Fähigkeiten von T-Zellen in Ab- und Anwesenheit von CD152-Signalen fielen zu diesem Zeitpunkt und unter den experimentellen Bedingungen geringer aus, waren aber für CXCL12 annähernd signifikant ($p=0.058$, Index mit anti-CD3/anti-CD28anti-IgG: 5,2, mit anti-CD3/anti-CD28/anti-CD152: 8,5) und für den CCR7-Liganden CCL19 signifikant ($p=0,029$, Index mit anti-CD3/anti-CD28anti-IgG: 3,0, mit anti-CD3/anti-CD28/anti-CD152: 4,9) (Abb. 7 A).

Um den Einfluss von CD152-Signalen auf die Migrationskapazität von T_H1 -Zellen zu bestätigen, wurde in weiteren Versuchsansätzen die CD152-kodierende cDNA in Milzzellen CD152-defizienter Tiere rekonstituiert. Die retrovirale Transduktion aktivierter CD152^{-/-} Zellen mit Viren, die Vektoren mit der CD152-cDNA enthielt (pMSCV-CD152), führte zur Einschleusung des Reportergens GFP (grün fluoreszierendes Protein) und der cDNA von CD152. CD4⁺ T-Zellen, die mit pMSCV-CD152 bzw. mit dem Kontrollvektor (pMSCV) erfolgreich transduziert worden waren, wurden am Ende der sekundären Stimulation unter T_H1 -Bedingungen in Chemotaxisversuchen über GFP identifiziert und ihr Migrationsverhalten analysiert (Abb. 7 B). Kontrollvektor-transduzierte T-Zellen ohne CD152-Signale erreichten einen 4,4-fachen Anstieg der Migrationsrate zu CCL4 verglichen mit der zum Medium. In CD152^{-/-} T_H1 -Zellen konnte die Migration zu CCL4 durch die Rekonstitution von CD152 um das fast 7-fache der Basismigration erhöht werden und erreichte damit das Niveau von CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1 -Zellen (Abb. 7 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD152-Signale die chemotaktischen Fähigkeiten im Zusammenspiel mit CD28- und CD3-Signalen ohne Einwirkung zusätzlicher Faktoren von APZ verändern können. Die Expression von CD152-Protein kann auch in voraktivierten CD4⁺ T-Zellen das Migrationsverhalten beeinflussen.

3.4 Die CD152-vermittelte Chemotaxis von T_H1 -Zellen steigt mit der Aktivierungsstärke der Zellen

Im nächsten Versuchsansatz sollte analysiert werden, ob die CD152-vermittelte Migrationsfähigkeit von T-Zellen durch eine starke Aktivierung funktionell erhöht werden kann. Die Funktionalität von CD152 ist abhängig von der Oberflächenexpression auf den T-Zellen [26], die ihrerseits über die Aktivierung der T-Zellen über den TZR und CD28 ausgelöst wird und mit der Stärke der TZR-Antigen-Interaktion korreliert [30].

CD4⁺TZR^{tg}CD152^{-/-} und CD4⁺TZR^{tg}CD152^{+/+} T-Zellen wurden unter T_H1 -Bedingungen mit APZ entweder mit 1 µg/ml oder mit 10 µg/ml OVA-Peptid spezifisch stimuliert. Bei Verwendung von

1 $\mu\text{g/ml}$ OVA-Peptid zeigten $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{+/+}$ CD4^+ T_{H1} -Zellen sechs Tage nach Beginn der sekundären Stimulation einen 2,4-fach höheren chemotaktischen Index bei der Migration zu T_{H1} -assoziiertem CCL4 als $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{-/-}$ CD4^+ T-Zellen (Abb. 8) (Index: $\text{CD152}^{-/-}$: 2,8, $\text{CD152}^{+/+}$: 6,7). Bei starkem Stimulus mit 10 $\mu\text{g/ml}$ OVA-Peptid migrierten 12,5-fach mehr $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{+/+}$ CD4^+ T_{H1} -Zellen zu CCL4 als zu Medium, während der chemotaktische Index bei $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{-/-}$ CD4^+ T_{H1} -Zellen fast unverändert zum Wert nach der Aktivierung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ OVA-Peptid war (Index $\text{CD152}^{-/-}$: 3,6 bei 10 $\mu\text{g/ml}$ zu 2,8 bei 1 $\mu\text{g/ml}$). Auch gegenüber CXCL12 wurde die gerichtete Migration durch die hohe Antigenkonzentration selektiv in $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{+/+}$ CD4^+ T_{H1} -Zellen von 4,8 auf 9,1 erhöht, während sie bei CD152 -defizienten CD4^+ T_{H1} -Zellen unabhängig von der Antigen dosis bei einem Index von 3,8 konstant blieb. Selbst die Migration zu dem homöostatischen Chemokin CCL19, dessen

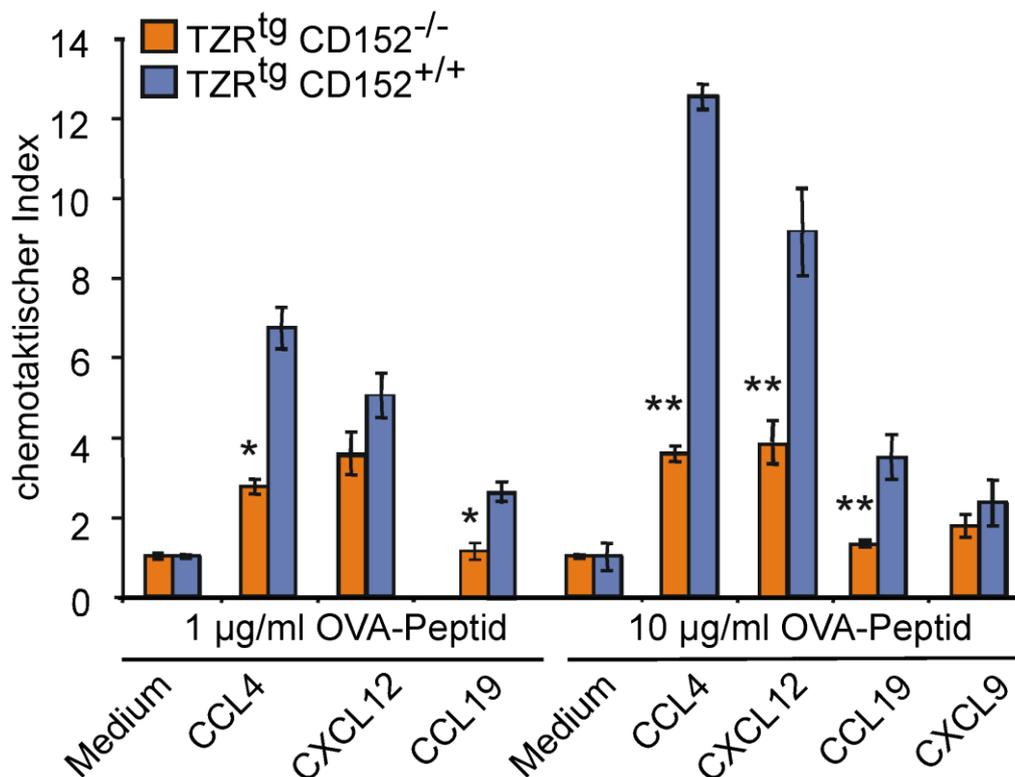


Abb. 8: Die Migrationsfähigkeit CD152 -kompetenter T_{H1} -Zellen ist abhängig von der Stärke der T-Zellaktivierung. CD4^+ T-Zellen aus $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{-/-}$ und $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{+/+}$ Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 1 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_{H1} -polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 6 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen über Dichtezentrifugation gereinigt und durch *in vitro* Chemotaxisversuche auf ihre Migrationsfähigkeit zu 10 nM CCL4, 20 nM CXCL12, 10 nM CCL19 und 100 nM CXCL9 untersucht (vergl. Abb. 5). Dargestellt ist der chemotaktische Index der CD4^+ T_{H1} -Zellen von einem repräsentativen Experiment aus drei Versuchen.

Rezeptor CCR7 unter T_H1 -Bedingungen nur gering exprimiert wird, zeigte sich in CD152-kompetenten T_H1 -Zellen konzentrationsabhängig. Der chemotaktische Index lag in $TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4^+$ T-Zellen bei 1,2 mit schwächerem bzw. 1,3 mit stärkerem Stimulus und stieg in $TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4^+$ T-Zellen von 2,5 bei schwächerem auf 3,5 mit stärkerem Stimulus (Abb. 8). Erneut wurde die Migrationsfähigkeit der T_H1 -Zellen zu dem inflammatorischen Chemokin CXCL9 auch bei starken Stimulationsbedingungen nicht durch CD152-Signale beeinflusst, der chemotaktische Index wurde im Vergleich mit der Basismigration nur leicht erhöht, in CD152-defizienten T_H1 -Zellen 1,8-fach und in CD152-kompetenten T_H1 -Zellen 2,3-fach.

Die CD152-vermittelte Migration zu CCL4 bzw. CXCL12 über die induzierbaren Chemokinrezeptoren CCR5 bzw. CXCR4 wurde in CD152-kompetenten T_H1 -Zellen entsprechend zur Antigenkonzentration und damit zur Stärke und Dauer der TZR-Stimulation erhöht. Chemotaxis, die über den Chemokinrezeptor CXCR3 vermittelt wird, wurde zu diesem Zeitpunkt nicht von CD152-Signalen beeinflusst.

3.5 Die CD152-vermittelte Chemotaxis besteht über eine Endothelbarriere

Im Organismus bilden Endothelien Barrieren, die beim Verlassen der Blutgefäße zur Einwanderung der Zellen in Gewebe überwunden werden müssen. Gleichzeitig ermöglichen Endothelien durch die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle die Anheftung von aktivierten Lymphozyten, die die entsprechenden Liganden auf der Oberfläche tragen. Um das Migrationsverhalten über eine physiologische Endothelbarriere hinweg zu analysieren, wurden Selektin-exprimierende, murine Endothelzellen (ml-END) auf den Membranen des Transwell-Systems für 48 Stunden kultiviert bis eine komplette einlagige Schicht gewachsen war (Abb. 9 A).

Anschließend wurden $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ und $TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4^+$ T_H1 -Zellen nach sechs Tagen sekundärer Stimulation auf das Endothel bzw. auf Fibronectin-beschichtete Membranen gegeben, und die Chemotaxis zu den Chemokinen CCL4, CXCL12 und CCL19 wurde untersucht. Sowohl mit als auch ohne Endothelschicht zeigten sich signifikant höhere chemotaktische Indizes der $TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4^+$ T_H1 -Zellen zu allen getesteten Chemokinen im Vergleich mit $TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4^+$ T_H1 -Zellen (Abb. 9 B). Die Migration von CD152-kompetenten T_H1 -Zellen zu CCL4 war mit Indizes von 8,4 ohne bzw. 9 mit Endothel gegenüber der Migration CD152-defizienter T_H1 -Zellen mehr als verdoppelt (Index: 4 ohne bzw. 4,3 mit Endothel). In den Kammern mit dem Liganden CXCL12 als Agonist für den Chemokinrezeptoren CXCR4 lagen die Indizes von $TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4^+$ T_H1 -Zellen ohne

Endothel 3,8-fach höher als bei Medium bzw. mit Endothel etwa 3-fach höher als bei Mediumkontrollen. Dagegen fanden sich ca. 9-fach mehr $TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4^{+} T_H1$ -Zellen ohne Endothel bzw. 5,5-fach mehr $TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4^{+} T_H1$ -Zellen mit Endothel im Vergleich zur Basismigration wieder. Die Anzahl der Zellen, die durch das homöostatische Chemokin CCL19 angelockt wurden, fiel unter den gegebenen T_H1 -Bedingungen geringer aus. Die Migration von $TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4^{+} T_H1$ -Zellen lag mit Indizes von 1,3 ohne bzw. 1,6 mit Endothel kaum über der Basismigration. $TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4^{+} T_H1$ -Zellen migrierten fast 4-fach mehr zu CCL19 verglichen mit Medium (Abb. 9 B).

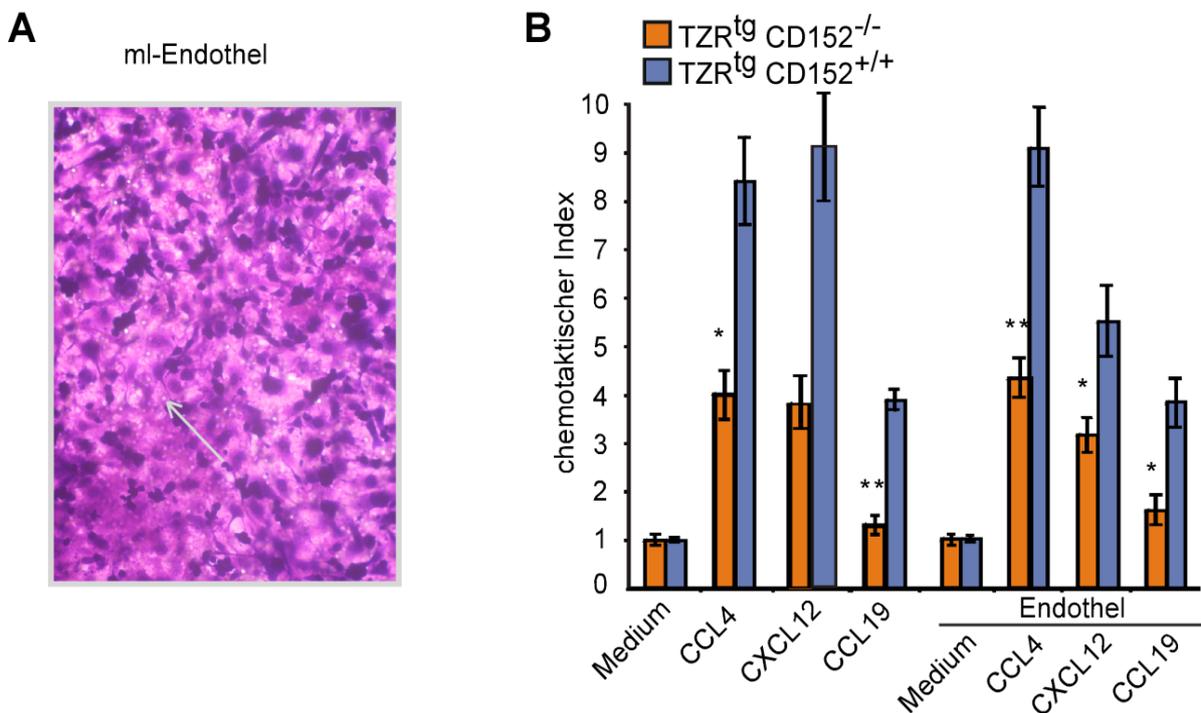


Abb. 9: Die Migration zu CCL4, CXCL12 und CCL19 über eine Endothelschicht ist in CD152-kompetenten T_H1 -Zellen erhöht. A Konfluentes Wachstum der Endothelschicht. Die endothelbeschichteten Membranen des Transwell-Systems wurden nach Durchführung der Versuche fixiert und Zellkerne und Zytoplasma wurden mit 5 % GIEMSA-Lösung angefärbt. Die Vollständigkeit der einlagigen Endothelzellschicht auf den Membranen wurde mikroskopisch kontrolliert. Der Pfeil kennzeichnet exemplarisch eine der Poren der Membran (200-fache Vergrößerung). **B** $CD4^{+} T$ -Zellen aus $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ - und $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 10 μ g/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierter APZ unter T_H1 -polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 6 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen auf die Membranen der Transwell-Systeme gegeben, die zum Teil mit einer konfluenten Einzelzellschicht von Endothelzellen (ml-END, *murine mesenterial lymph node derived endothelial cell line*) bewachsen waren. Die Chemotaxisversuche wurden wie in Abb. 5 beschrieben durchgeführt. Die Migration der $CD4^{+} T_H1$ -Zellen mit und ohne Endothelschicht zu optimalen Chemokinkonzentrationen ist als chemotaktischer Index der Mittelwerte aus Triplikaten (+/- Standardabweichung) dargestellt. Abgebildet sind die repräsentativen Ergebnisse eines Versuchs von zwei vergleichbaren Experimenten.

3.6 Die CD152-vermittelte Migration ist unabhängig von IFN- γ

CD152-Signale können bereits in der Entwicklungsphase der T-Zellen auf die Differenzierung zu inflammatorischen T_H1 -Zellen Einfluss nehmen, da bei fehlendem CD152-Signal die T_H2 -Entwicklung gefördert wird [83,84]. Um auszuschließen, dass der Effekt von CD152-Signalen auf das Migrationsverhalten von T_H1 -Zellen auf Unterschieden in der frühen Differenzierung beruhte, wurde die Polarisierung der T-Zellen anhand der milieuprägenden Zytokinproduzenten verschiedener T-Zellsubpopulationen kontrolliert.

TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T-Zellen wurden zum Zeitpunkt der Migrationsanalysen nach fünf Tagen sekundärer Stimulation unter T_H1 -Bedingungen mit PMA/Ionomycin aktiviert und unter Zugabe von Brefeldin A inkubiert, um die Sekretion der Zytokine zu verhindern (Abb. 10). Nach Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Membranen wurden CD4⁺ T_H -Zellen auf ihre Zytokinproduktion untersucht. IL-4-produzierende T_H2 -Zellen konnten weder bei CD152-defizienten noch bei CD152-kompetenten CD4⁺ T_H -Zellen nachgewiesen werden. Auch supprimierende IL-10-Produzenten oder pro-inflammatorische IL-17-Zellen konnten sich unter den stringenten T_H1 -Bedingungen nicht entwickeln (Abb. 10).

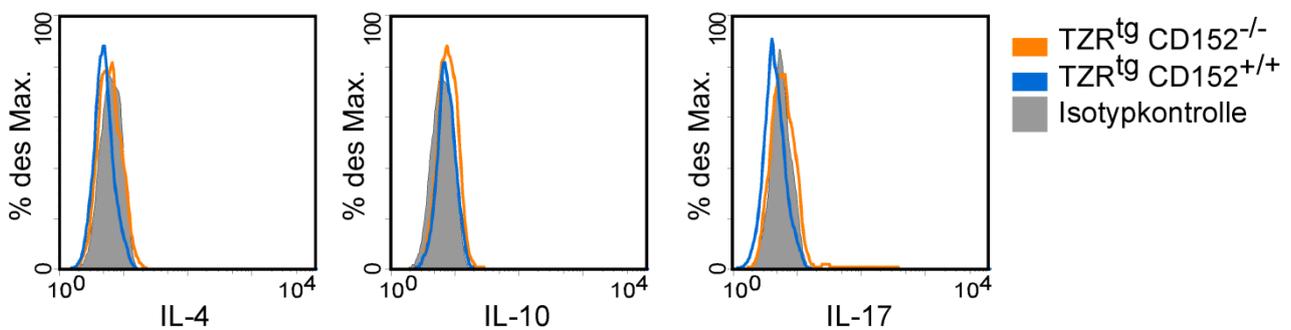


Abb. 10: CD152-kompetente- und CD152-defiziente T-Zellen bilden unter T_H1 -Bedingungen keine IL-4-, IL-10- und IL-17-Produzenten aus. CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-}- und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden mit 10 μ g OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter polarisierenden T_H1 -Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 5 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin für 5 h inkubiert, wobei für die letzten 2 h Brefeldin A zugesetzt wurde. In fixierten Zellen wurde die Zytokinproduktion nach intrazellulärer Markierung durchflusszytometrisch gemessen. Die Histogramme zeigen die Anzahl der Zytokinproduzenten in der CD4⁺-Zellpopulation als Prozent des Maximums (s. Kapitel 2.9). Die Isotypkontrollen zu den jeweiligen fluoreszenten Interleukin-Antikörpern sind grau unterlegt. Ein Ergebnis aus zwei vergleichbaren Versuchen ist dargestellt.

Pro-inflammatorische T_H1 -Zellen produzieren Zytokine wie IL-2 und vor allem IFN- γ , um ein wachstumsförderndes Milieu für T_H1 -Zellen zu erhalten. Die Bedeutung von IL-2 auf die Migration zu CCL4 konnte nicht in funktionellen Chemotaxisversuchen untersucht werden, da sich degradiertes IL-2 *in vitro* an den Rezeptor CCR5 lagert und die *in vitro* Migration blockiert [239]. Ein deutlicher Effekt von IL-2 auf die Migrationsfähigkeit ist außerdem nicht zu erwarten, da die Zugabe von IL-2 unter T_H1 -Bedingungen selbst auf die Überlebensrate von CD152-defizienten und CD152-kompetenten T_H1 -Zellen nur einen geringen Einfluss zeigte [48].

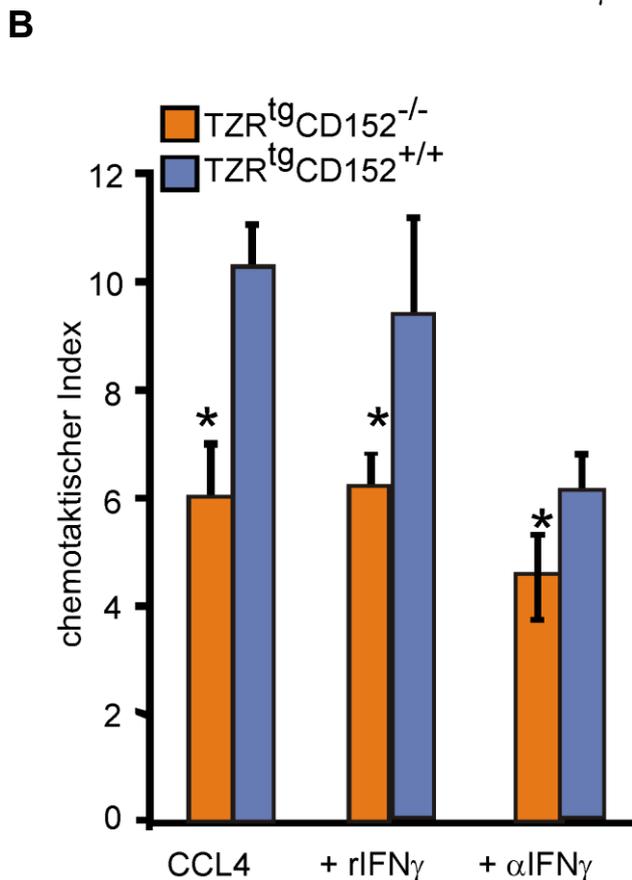
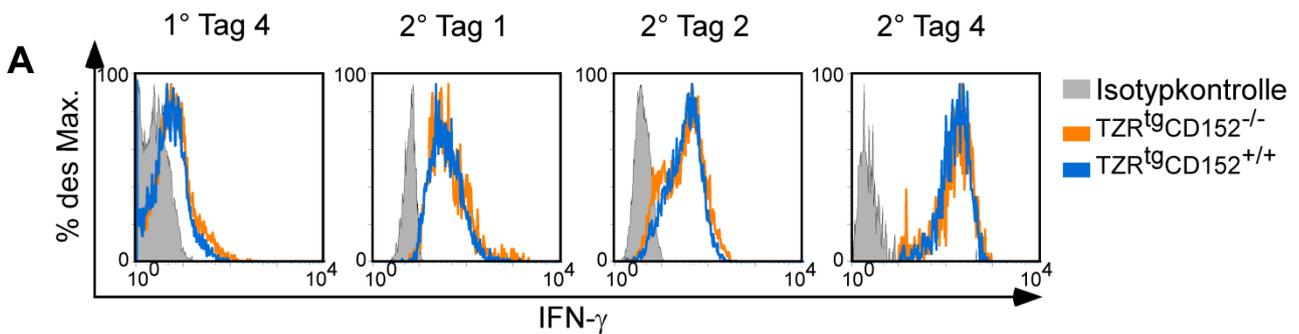


Abb. 11: Die CD152-vermittelte, differentielle Regulierung der Chemotaxis von CD4⁺ T_H1-Zellen zu CCL4 ist unabhängig von IFN- γ .

A CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden mit 10 μ g OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter polarisierenden T_H1-Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin für 5 h inkubiert, wobei für die letzten 2 h Brefeldin A zugesetzt wurde. In fixierten Zellen wurde die Zytokinproduzenten nach intrazellulärer Markierung durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Anzahl der Zytokinproduzenten in der CD4⁺-Zellpopulation als Prozent des Maximums (s. Kapitel 2.9). **B** TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T-Zellen wurden wie unter A beschrieben stimuliert. Es wurden 20 ng/ml rekombinantes IFN- γ oder 10 μ g/ml blockierender IFN- γ -Antikörper zugegeben. Nach 6 Tagen sekundärer Stimulation wurden lebende CD4⁺ T-Zellen in Migrationsversuchen eingesetzt. Dargestellt ist der chemotaktische Index (Mittelwert \pm Standardabweichung) von einem aus drei vergleichbaren Versuchen.

Die Bedeutung des wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ wurde über die Dauer der Stimulation überprüft, um auszuschließen dass unterschiedliche IFN- γ Konzentrationen zwischen CD152-defizienten und CD152-kompetenten T_H1-Zellen das unterschiedliche Migrationsverhalten verursachen (Abb. 11 A). Die durchflusszytometrische Analyse des Zytokins in CD4⁺ T_H1-Zellen über den Zeitraum der *in vitro* Kultur ergab in CD152-defizienten und CD152-kompetenten Zellpopulationen eine ähnliche Entwicklung der IFN- γ Produzenten. Zusätzlich wurden funktionelle Chemotaxisversuche unter IFN- γ Blockade und im Überschuss von IFN- γ durchgeführt (Abb. 11 B). TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T-Zellen wurden unter T_H1-Bedingungen stimuliert. Einem Teil der Zellen wurde für die gesamte Kulturperiode entweder rekombinantes murines IFN- γ (rIFN- γ) oder blockierender anti-IFN- γ -Antikörper zugesetzt. Nach sechs Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen auf ihr Migrationspotential gegenüber dem T_H1-assoziierten Chemokin CCL4 untersucht. Der Überschuss an IFN- γ durch die Zugabe von rekombinatem Zytokin bewirkte keine Veränderung der chemotaktischen Indizes weder bei CD152-defizienten T_H1-Zellen (Index: 6 ohne rIFN- γ , 6,2 mit rIFN- γ) noch bei CD152-kompetenten CD4⁺ T_H1-Zellen (Index 10,3 ohne rIFN- γ , 9,4 mit rIFN- γ). Die reduzierte Chemotaxis der TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4⁺ T_H1-Zellen konnte durch zugesetztes IFN- γ nicht erhöht werden. Blockierender anti-IFN- γ -Antikörper führte in CD4⁺ T-Zellen mit und ohne CD152-Signale zu geringerer spezifischer Migration, der signifikante Unterschied zwischen den Zellpopulationen blieb jedoch erhalten (Abb. 11 B); (Index 4,5 für CD152^{-/-}, 6,1 für CD152^{+/+}).

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD152-defiziente und CD152-kompetente CD4⁺ T-Zellen unter stringenten T_H1-Bedingungen ähnlich differenzieren und dass der Effekt von CD152-Signalen auf das Migrationsverhalten von T_H1-Zellen unabhängig von IFN- γ ist.

3.7 Antigenpräsentierende Zellen beeinflussen die CD152-gesteuerte Migrationskapazität

Für die Untersuchung, ob die Art der Aktivierung von T-Zellen durch unterschiedliche APZ auch im weiteren Verlauf der T-Zellentwicklung funktionelle Auswirkungen hat, wurde das chemotaktische Verhalten der T-Zellen untersucht. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Expression von CD152-Molekülen auf der Oberfläche von T-Zellen durch die Art der Antigen-präsentierenden Zellen beeinflusst werden kann. Der Nachweis der Expression von CD152-Molekülen auf der Oberfläche von murinen T-Zellen wurde durch eine signalverstärkende Liposomentechnik möglich. Bei Präsentation des Antigens durch aktivierte B-Zellen konnten maximal 5 % der CD4⁺ T-Zellen CD152-Proteine exprimieren; wurde das

Antigen dagegen von gereiften dendritischen Zellen (DZ) präsentiert, waren auf ca. 25 % der $CD4^+$ T-Zellen $CD152$ -Moleküle auf der Oberfläche nachweisbar [240].

$CD4^+CD62L^+TZR^{tg}CD152^{+/+}$ T-Zellen wurden entweder mit aktivierten B-Zellen oder mit gereiften DZ unter T_H1 -Bedingungen mit OVA-Peptid stimuliert. Nach sechs Tagen primärer Stimulation wurden das Migrationspotential der $CD4^+$ T-Zellen zu CCL4 und CXCL12 untersucht (Abb. 12). $CD4^+$ T-Zellen, die das Antigen von B-Zellen präsentiert bekamen, wiesen nur 1,7-fach (CCL4) bzw. 2,1-fach (CXCL12) mehr Zellen in den Chemokinlösungen auf als in den Mediumkontrollen. Dagegen zeigten T-Zellen, die mit gereiften DZ als APZ aktiviert wurden, erhöhte Migrationsraten auf. Verglichen mit der Basismigration waren sie um den Faktor 4,6 bei der Anlockung durch CCL4 bzw. 6,3 bei CXCL12 erhöht (Abb. 12). Dies entspricht einer 2,7- bzw. 3-fachen Steigerung gegenüber durch B-Zellen aktivierten T-Zellen.

Dieses Ergebnis korreliert mit der erhöhten $CD152$ -Expression, die durch die Antigenpräsentation durch DZ ausgelöst wird, und zeigt die Bedeutung von DZ als professionelle APZ bei $CD152$ -vermittelten Effekten der T-Zelllokalisierung.

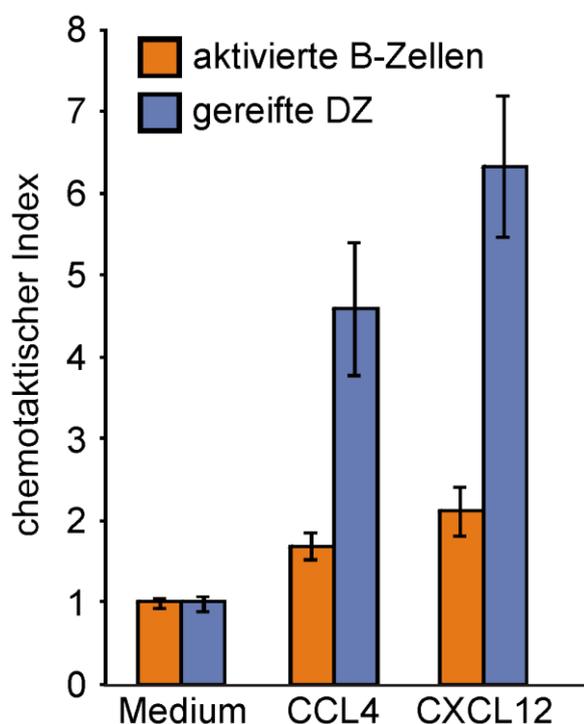


Abb. 12: Die Antigenpräsentation durch DZ erhöht die Migration $CD152$ -kompetenter Zellen. $CD4^+CD62L^+$ T-Zellen aus $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 1 μ g/ml OVA-Peptid entweder von B-Zellen oder DZ als APZ unter T_H1 -polarisierenden Bedingungen stimuliert. B-Zellen waren zuvor 24 h mit LPS aktiviert worden; aus dem Knochenmark gezogene DZ kongener Tiere wurden für 24 h mit $TNF-\alpha$ gereift. Nach 6 Tagen primärer Stimulation wurden lebende Zellen bei *in vitro* Chemotaxisversuchen analysiert (vergl. Abb. 5). Die Migration der $CD4^+$ T-Zellen aus Triplikaten ist als chemotaktischer Index (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt. Ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen ist abgebildet.

3.8 CD152-kompetente CD4⁺ T-Zellen zeigen erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR5

Die chemotaktischen Fähigkeiten von Lymphozyten werden über die Expression der Chemokinrezeptoren gesteuert, allerdings spiegelt sich eine hohe Rezeptordichte nicht in allen Fällen in erhöhter Migration wider [241].

Um zu klären, ob die über CD152-Signale vermittelte erhöhte Migration von T-Zellen mit einer positiven Regulierung der Chemokinrezeptorexpression korreliert, wurden Zellen aus Mäusen mit genetischer Deletion im *ctla-4*-Gen analysiert. CD152^{-/-} und CD152^{+/+} Zellen wurden polyklonal stimuliert und nach drei Tagen sekundärer Stimulation auf die Expression von CXCR4, CCR7 und CCR5 auf CD4⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Für die Analyse der Expression von CXCR4 und CCR5 erfolgte der Versuchsansatz unter T_H1-Konditionen, da der induzierbare CCL4 Rezeptor CCR5 nur unter Zugabe von IL-12 exprimiert wird [242].

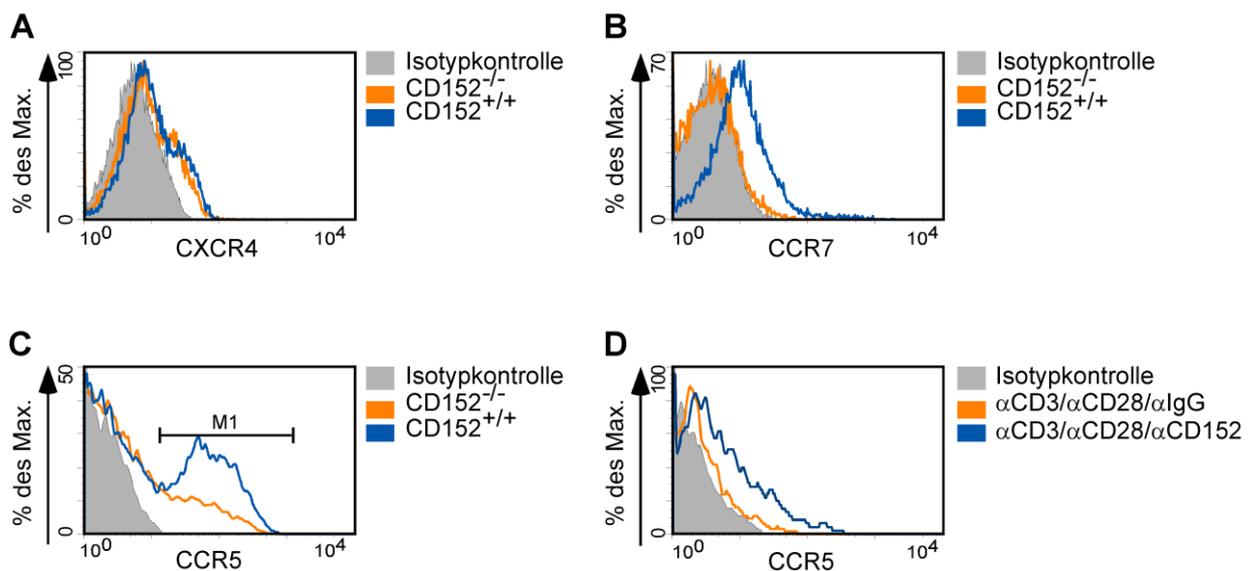


Abb. 13: CD152-Signale erhöhen die Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR5. A, B, C CD152^{-/-} - und CD152^{+/+} Milzzellen wurden polyklonal primär und sekundär mit anti-CD3 Antikörpern aktiviert. Nach 3 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern für die angegebenen Chemokinrezeptoren so wie CD4 markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Oberflächenexpression von A CXCR4 und C CCR5 auf T_H1-polarisierten CD4⁺ T-Zellen und B von CCR7 auf unpolarisierten CD4⁺ T-Zellen. D Polyklonal unter T_H1-Bedingungen stimulierte CD152^{+/+} und CD152^{-/-} Milzzellen wurden sekundär mit plattengebundenen anti-CD3- und anti-CD28 Antikörpern für 48 h stimuliert, gewaschen, und für weitere 24 h mit Antikörper-beschichteten Mikropartikeln (0,25 µg/ml/2 µg/ml/5,75 µg/ml anti-CD3/anti-CD28/Hamster-IgG bzw. anti-CD3/anti-CD28/anti-CD152) inkubiert. Die Expression von CCR5 wurde nach Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern auf CD4⁺ T-Zellen detektiert (M1: 18,6 % CD152^{-/-}, 34,8 % CD152^{+/+}). Die jeweiligen Isotypkontrollen zu den verwendeten fluoreszenten Chemokinrezeptorantikörpern sind als graue Histogramme unterlegt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei Experimenten.

Die Expression von CXCR4, dem selektiven Rezeptor von CXCL12, war in CD152-defizienten und CD152-kompetenten CD4⁺ T_H1-Zellen gleichermaßen erhöht und damit unabhängig von CD152-Signalen (Abb. 13 A). Die Expression des CCL19 Rezeptors CCR7 war in CD152-defizienten CD4⁺ T-Zellen nicht nachweisbar, während CCR7 in CD152-kompetenten Zellen deutlich erhöht war (Abb. 13 B); (mittlere Fluoreszenzintensität (MFI): CD152^{-/-} 6,19, CD152^{+/+} 21,49). 18,6 % der CD152-defizienten Zellen wiesen nach drei Tagen sekundärer Stimulation eine Expression von CCR5 auf, während mit 34,8 % fast doppelt so viele CD152-kompetente CD4⁺ T_H1-Zellen CCR5 exprimierten (Abb. 13 C). Zur Bestätigung der erhöhten CCR5-Expression in Anwesenheit von CD152-Signalen wurden polyklonal aktivierte Wildtypzellen sekundär stimuliert und nach Gabe eines definierten CD152-Signals durch Mikropartikel, die mit anti-CD3-, anti-CD28- und anti-CD152- bzw. Kontroll-Antikörpern beschichtet waren, auf die Expression von CCR5 untersucht. Die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28/anti-IgG-beschichteten Mikropartikeln führte nicht zur Expression von CCR5 (MFI 4,71). Auf der Oberfläche der CD4⁺ T_H1-Zellen, die ein CD152-Signal erhalten hatten, waren CCR5-Proteine verstärkt nachweisbar, der MFI lag bei 18,5 (Abb. 13 D). CD152-Engagement verstärkte die Rezeptor-Expression von CCR7 und CCR5 auf CD4⁺ T-Zellen und diese korreliert mit der erhöhten Migrationsrate der CD152-kompetenten CD4⁺ T-Zellen zu den entsprechenden Chemokinen CCL19 und CCL4 (Abb. 14).

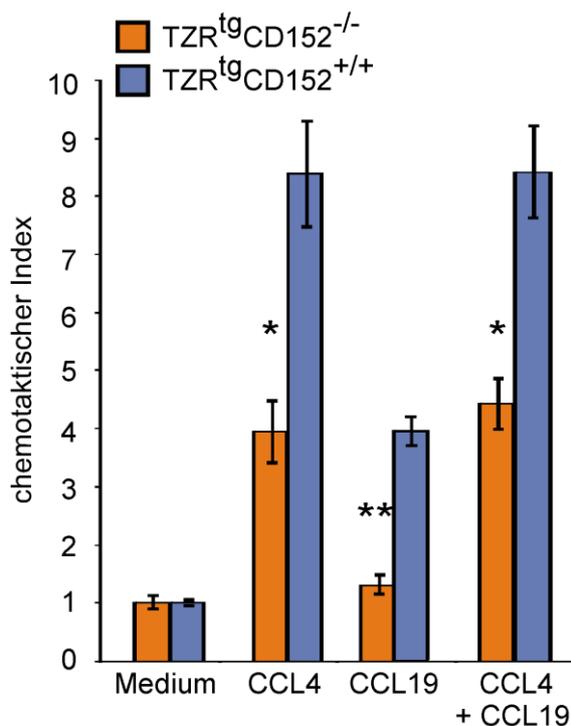


Abb. 14: Kein additiver Effekt der Migration von T_H1-Zellen zu CCL4 plus CCL19. CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 10 µg/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1-polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 6 Tagen sekundärer Stimulation wurde die Migrationsfähigkeit lebender Zellen zu 10 nM CCL4, 10 nM CCL19 oder zu CCL4-plus-CCL19 (je 10 nM) bei *in vitro* Chemotaxisversuchen analysiert (vergl. Abb. 5). Die Migration der CD4⁺ T-Zellen aus Triplikaten ist als chemotaktischer Index (Mittelwert +/- Standardabweichung) dargestellt. Ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen ist abgebildet.

Für die Untersuchung, ob die durch CD152-beeinflusste Migration der T_H1-Zellen zum inflammatorischen Chemokin CCL4 und zum homöostatischen Chemokin CCL19 durch verschiedene T-Zellsubpopulationen erfolgte, wurden funktionelle Chemotaxisversuche durchgeführt. Ein Nachweis im Durchflusszytometer war aufgrund der polarisierenden T_H1-Bedingungen nicht möglich, da diese für die Expression von CCR5 auf T_{EFF} nötig sind, aber zu Reduktion der CCR7-Expression führen [139,242].

TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen wurden in der Sekundärstimulation in Transwell-Experimenten auf die Reaktivität zu den Chemokinen CCL4 oder CCL19 allein oder in Kombination getestet (Abb. 14). Die chemotaktischen Indizes der CD152-kompetenten T-Zellen zu CCL4, CCL19 und CCL4-plus-CCL19 waren 2-fach höher als die der CD152-defizienten T-Zellen. Eine 8,4-fach höhere Anzahl an TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T-Zellen war, verglichen mit Mediumkontrollen, in den CCL4-Chemokinlösungen wiederzufinden, und 3,9-fach mehr Zellen migrierten zu CCL19-Gradienten. Bei der Kombination von CCL4 und CCL19 ergab sich weder bei TZR^{tg}CD152^{-/-} noch bei TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen ein additiver Effekt (Abb. 14). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die entsprechenden Rezeptoren CCR5 und CCR7 unter diesen Versuchsbedingungen auf den gleichen T-Zellen exprimiert sind und keine unterschiedlichen Subpopulationen repräsentieren.

3.9 CCL4-induzierte Rezeptorsignale in T_H1-Zellen sind abhängig von G-Proteinen und werden über GRK2 moduliert

Die Ergebnisse der Chemokinrezeptorexpression, die nur teilweise durch CD152-Signale moduliert wurden, haben gezeigt, dass CD152-vermittelte Migration nicht ausschließlich über die Expression der Rezeptoren gesteuert wird, sondern dass auch andere Mechanismen zur Regulation der Chemotaxis beitragen. Zum Beispiel war das Migrationsverhalten zu CXCL12 in CD152-defizienten und CD152-kompetenten T_H1-Zellen trotz gleicher Expression des Rezeptors CXCR4 unterschiedlich (z. B. Abb. 9 B und Abb. 13 A). Auch exprimierten 66-70 % der CD4⁺ T_H1-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren nach drei Tagen sekundärer Stimulation gleichermaßen CCR5 (ohne Abb.). Unabhängig von der vergleichbaren Expression zeigte sich eine 5-fach höhere chemotaktische Fähigkeit CD152-kompetenter Zellen zu CCL4 im Vergleich mit CD152-defizienten T_H1-Zellen (ohne Abb.). Diese Daten wiesen ebenfalls auf andere Ebenen der Regulation hin.

Die Signale der Chemokinrezeptoren werden meistens über G α -Proteine weitergeleitet. Dies kann über G-Protein-gekoppelte Kinasen (GRK) verhindert werden, die die Desensibilisierung

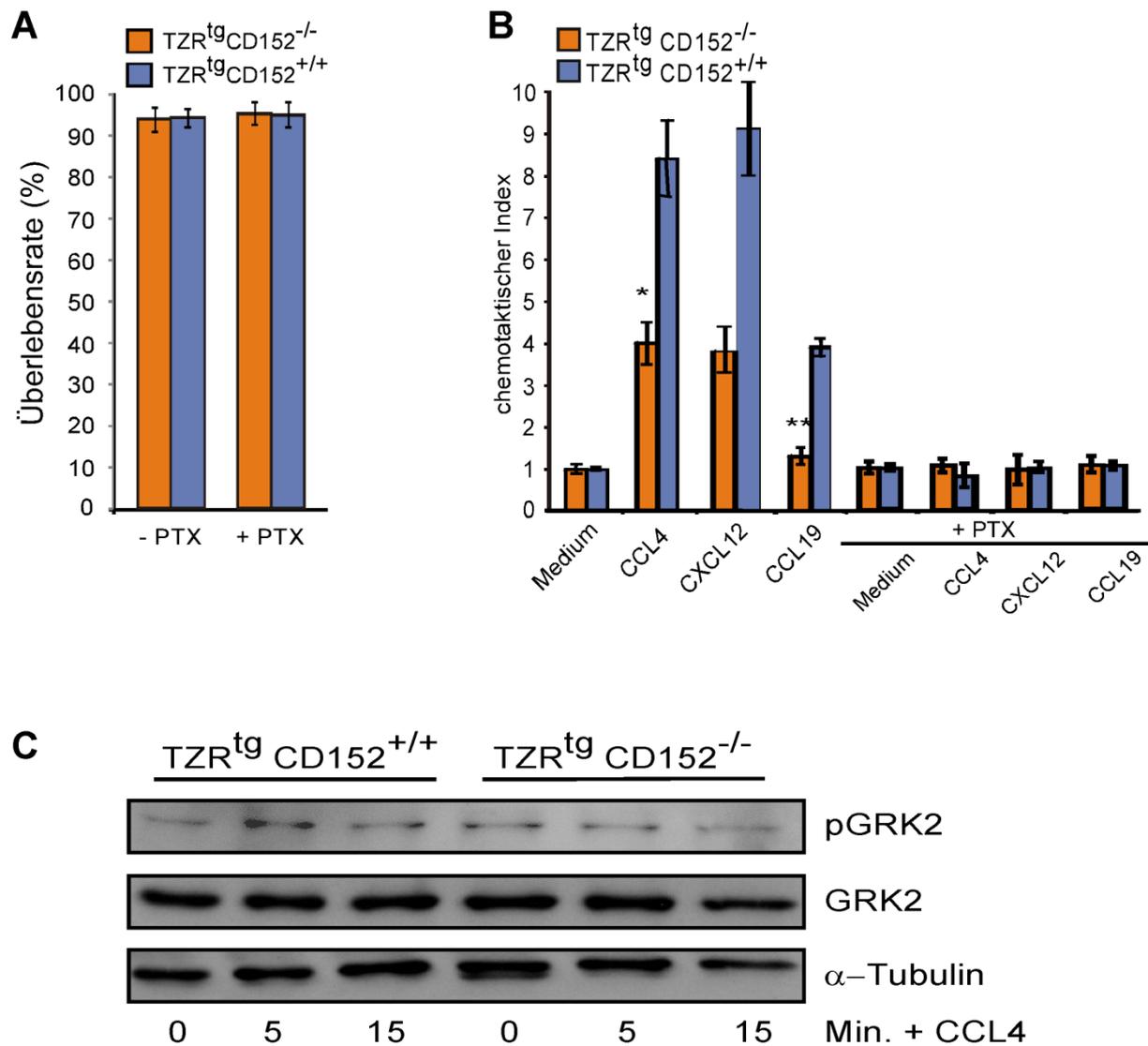


Abb. 15: Signale der CD152-vermittelten Migration werden über GRK2 moduliert. A PTX führt nicht zu erhöhter Zellsterblichkeit. CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 10 μ g/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1-polarisierenden Bedingungen primär stimuliert. Nach 5 Tagen wurde einem Teil der Zellen 100 ng/ml PTX zugesetzt. Nach 18 h wurde die Überlebensrate von CD4⁺ T-Zellen durch Zugabe von Propidiumjodid durchflusszytometrisch analysiert. **B CD152-vermittelte Chemotaxis ist abhängig von Gai-Proteinen.** CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 10 μ g/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1-polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 6 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen z.T. mit 100 ng/ml PTX für 2 h bei 37°C inkubiert, bevor sie in Chemotaxisversuchen eingesetzt wurden (vergl. Abb. 5). **C Inaktives, phosphoryliertes GRK2 korreliert mit der erhöhten CD152-vermittelten Migration.** CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{+/+} und TZR^{tg}CD152^{-/-} Tieren wurden wie unter B stimuliert. Nach 5 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen Ficoll-gereinigt und 2 h in FCS-freiem Medium ruhen gelassen, bevor sie mit 20 nM CCL4 für 5 und 15 Min. inkubiert wurden. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine mit spezifischen HRP-gekoppelten Antikörpern in Westernblotanalysen detektiert.

der Rezeptoren einleiten. In den folgenden Experimenten wurde die Beteiligung der G-Proteine an den Migrationsprozessen in TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} *in vitro* differenzierten CD4⁺ T_H1-Zellen nach sechs Tagen sekundärer Stimulation untersucht. Dazu wurde die Bindung der G-Proteine an Chemokinrezeptoren durch zweistündige Inkubation mit Pertussistoxin verhindert [169]. Die Behandlung mit diesem Inhibitor beeinträchtigte die Lebensfähigkeit der T_H1-Zellen in dieser Zeit nicht (Abb. 15 A). In anschließenden Transwell-Experimenten zeigten sowohl TZR^{tg}CD152^{-/-} als auch TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen nur Basismigration zu den Chemokinen CCL4, CXCL12 und CCL19 (Abb. 15 B). Die Migration ist somit von der Signalübermittlung durch G-Proteine abhängig.

Um nachzuweisen, dass GRK2, dessen Bedeutung für die CCL4-vermittelte Migration in Mausmodellen demonstriert wurde [197], die Migrationskapazität CD152-vermittelt modulieren kann, wurden Proteine von TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T-Zellen in Westernblot-Analysen auf GRK2 und phosphoryliertes GRK2 untersucht. Die phosphorylierte, inaktive Zustandsform von GRK2 verhindert die Kinasetätigkeit, die zur Desensibilisierung, Internalisierung und Degradation des Rezeptors führt. *In vitro* differenzierte T_H1-Zellen von TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden nach fünf Tagen sekundärer Stimulation mit Chemokinen für 5 Minuten bzw. 15 Minuten zur Auslösung von Chemokinrezeptorsignalen inkubiert. Bei vergleichbarer Menge des Gesamtproteins GRK2 und des Kontrollproteins α -Tubulin zeigten Zelllysate aus TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen nach 5 Minuten Aktivierung durch CCL4 einen Anstieg der phosphorylierten Form von GRK2. In TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4⁺ T_H1-Zellen war keine Phosphorylierung von GRK2 nach der Zugabe von CCL4 feststellbar (Abb. 15 C).

3.10 Akt vermittelt in CD152-kompetenten T_H1-Zellen Signale der Chemokinrezeptoren

Neben der Regulierung der Chemokinrezeptoren über die Desensibilisierung durch GRK werden von G-Proteinuntereinheiten verschiedene Signale nach Bindung der Liganden an Chemokinrezeptoren weitergeleitet. Signalprozesse können u. a. über MAPK-Kinasen und Phosphoinositol-3-Kinase (PI3'K) aktiviert werden [176,208]. Um die Beteiligung dieser Signalmoleküle an der CD152-vermittelten Migration von Th1-Zellen zu untersuchen, wurden ERK, ein Zielmolekül des MAPK-Signalweges, und Akt, das durch PI3'K aktiviert wird, analysiert.

T_H1-Zellen von TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden jeweils nach zwei und fünf Tagen sekundärer Stimulation mit CCL4 für 5 Minuten bzw. 20 Minuten inkubiert, fixiert und

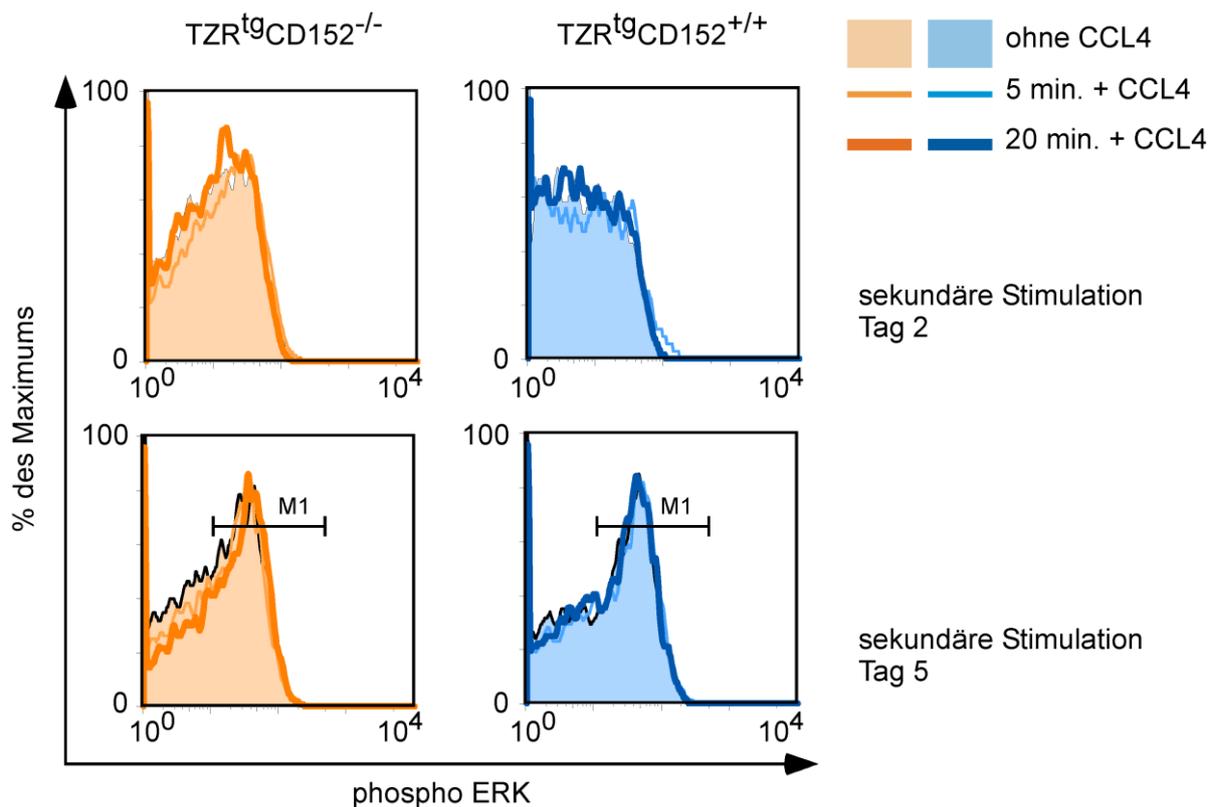


Abb. 16: ERK-Phosphorylierung nach Chemokinrezeptorstimulation. $CD4^+$ T-Zellen aus $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ und $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ Tieren wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1 -polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 5 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen Ficoll-gereinigt und 2 h in FCS-freiem Medium ruhen gelassen, bevor je 5×10^6 Zellen mit 20 nM CCL4 für 5 Min. und 20 Min. bei 37°C inkubiert wurden. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert, 60 Min. bei RT mit Phospho-spezifischen Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen den phospho-ERK-Status der $CD4^+$ T-Zellen vor (gefüllt), so wie 5 Min. und 20 Min. nach Zugabe von CCL4. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen ist abgebildet.

permeabilisiert. Antikörper, die spezifisch sind für die phosphorylierten und damit aktiven Formen von ERK (phospho-ERK) und Akt (phospho-Akt), ermöglichten die durchflusszytometrische Detektion der Signalmoleküle. Die phosphorylierte Form von ERK war nach 2 Tagen sekundärer Stimulation in CD152-defizienten T_H1 -Zellen gegenüber CD152-kompetenten Zellen leicht erhöht (Abb. 16 oben, MFI $CD152^{-/-}$ 5,4-8,0, $CD152^{+/+}$ 2,1-3,2). Die Stimulation des Chemokinrezeptors mit dem Liganden CCL4 führte zu keiner zusätzlichen ERK-Phosphorylierung der $CD4^+$ T_H1 -Zellen verglichen mit dem Aktivierungsstatus von ERK vor Zugabe des Chemokins. Die gefüllten Histogramme spiegeln den Ausgangswert wider (Abb. 16). Nach fünf Tagen sekundärer Stimulation, zu dem Zeitpunkt, an dem üblicherweise die Migrationsversuche durchgeführt wurden, zeigte sich eine vergleichbare Aktivierung von

ERK in CD152-defizienten- und CD152-kompetenten T_H1-Zellen (Abb. 16 unten): Die Anzahl ERK-positiver CD152-defizienter T_H1-Zellen lag ohne bzw. mit CCL4-Induktion über 5° Minuten und 20 Minuten bei 44,3 %, 48,2 % und 53,6 % und entsprechend bei CD152-kompetenten Zellen bei 49 %, 55,1 % und 54,3 %.

Um herauszufinden, ob PI3'K-gesteuerte Signalprozesse des Chemokinrezeptors CCR5 in T_H1-Zellen durch CD152-Signale moduliert werden können, wurden in ähnlichen Versuchsansätzen die Phosphorylierungen des PI3'K-Zielmoleküls Akt analysiert (Abb. 17). Die zur vollständigen Aktivierung von Akt benötigten Phosphorylierungsstellen, Serin 473 und Threonin 308, sowie die Gesamtmenge von Akt wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Zusätzlich wurde vor der Stimulation mit dem Chemokin die Aktivierung PI3'K-abhängiger Signalwege durch die Zugabe des PI3'K-Inhibitors Ly294002 blockiert.

Nach drei (ohne Abb.) und fünf Tagen sekundärer Stimulation von TZR^{tg}CD152^{-/-}- und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-polarisierten Zellen zeigten sich vergleichbare Expressionen von Gesamt-Akt (Abb. 17, oben). Die Expression von Gesamt-Akt beider Zellpopulationen blieb bei 5-bzw. 20-minütiger Stimulation des Chemokinrezeptors mit CCL4 und bei Blockade durch den PI3'K-Inhibitor nahezu unverändert. Die Phosphorylierung von Akt war in TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4⁺ T_H1-Zellen zu keinem Zeitpunkt nach der Chemokingabe nachweisbar. Weder am Serin- (Abb. 17, Mitte) noch am Threoninrest (Abb. 17, unten) stieg die Expression von phosphoryliertem Akt über den Ausgangswert vor Chemokinzusatz. TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen zeigten an beiden Phosphorylierungsstellen von Akt nach 5-minütiger Stimulation mit CCL4 einen deutlichen Anstieg (MFI Serin 50,6, Threonin 93,9). Während der Wert der ersten Phosphorylierungsstelle am Serin 473 nach 20 Minuten mit einem MFI-Wert von 20,2 wieder auf das Ausgangsniveau von 23,6 sank (Abb. 17, Mitte), blieben die Werte der Phosphorylierung am Threoninrest auch 20 Minuten nach Rezeptorstimulation mit einem MFI-Wert von 68,8 gegenüber dem Ausgangswert von 38,5 erhöht (Abb. 17, unten). Die Inhibierung von PI3'K durch Zugabe von Ly294002 verhinderte an beiden Aminosäureresten die Phosphorylierung von Akt in TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen.

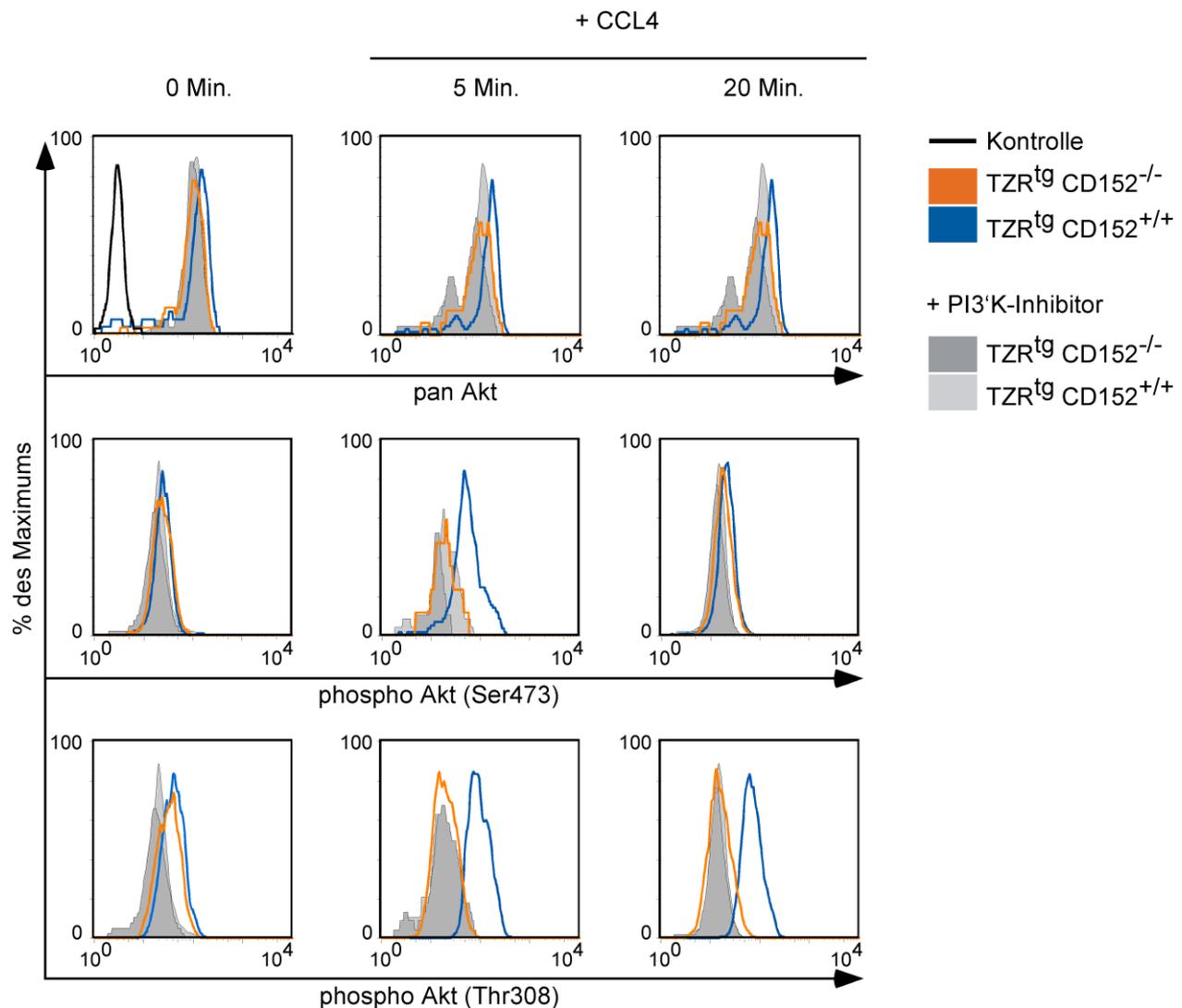


Abb. 17: PI3'K-abhängige Akt-Aktivierung in CD152-kompetenten T_H1-Zellen. CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden mit 10 µg/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1-polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Einem Teil der Zellen wurde nach 4 Tagen Sekundärstimulation für 20 h der PI3'K-Inhibitor Ly294.002 zugesetzt. Nach 5 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen per Dichtezentrifugation gereinigt und 2 h in FCS-freiem Medium ruhen gelassen. Je 5x10⁶ Zellen wurden mit 20 nM CCL4 für 5 Min. und 20 Min. bei 37°C inkubiert, danach fixiert, permeabilisiert und 60 Min. (RT) mit phospho-Akt- bzw. gesamt-Akt (pan-Akt)-spezifischen Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Akt-Expression auf CD4⁺ T-Zellen, die Isotypkontrolle ist exemplarisch im ersten Histogramm eingefügt (schwarze Kurve). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse eines Experiments von zwei unabhängigen Versuchen.

Die funktionelle Relevanz der differentiellen Akt-Aktivierung in CD152-defizienten- und CD152-kompetenten T_H1-Zellen für die Migration wurde in Chemotaxisversuchen analysiert (Abb. 18). *In vitro* differenzierte T_H1-Zellen von TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden vor der Verwendung am fünften Tag der sekundären Stimulation in Transwellssystemen

für 20 Stunden mit 1 μM bzw. 10 μM Akt-Inhibitor II oder PI3`K-Inhibitor inkubiert. Der chemotaktische Index der Migration CD152-defizienter $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen zu CCL4 war gegenüber CD152-kompetenten $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen um den Faktor 1,7 reduziert. Durch die Zugabe der Inhibitoren wurde bei CD152-defizienten Zellen der Index von 3,6 ohne Inhibitor nicht signifikant gesenkt (Index 3,0 mit 1 μM bzw. 3,4 mit 10 μM Akt-Inhibitor, 3,3 mit PI3`K-Inhibitor). CD152-kompetente $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen wurden durch den Akt-Inhibitor konzentrationsabhängig in ihrer Migrationskapazität verändert. Der chemotaktische Index sank von 6,2 ohne Inhibitor auf 5,4 unter Zugabe von 1 μM Akt-Inhibitor bzw. 2,9 bei 10 μM Akt-Inhibitor, was einer Inhibition von 13 % bzw. 53 % entspricht. Der Zusatz von PI3`K-Inhibitor senkte den chemotaktischen Index CD152-kompetenter $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen auf 3,9 und damit um 37 %. Die Migrationsfähigkeit lag damit auf dem Niveau CD152-defizienter Zellen (Abb. 18).

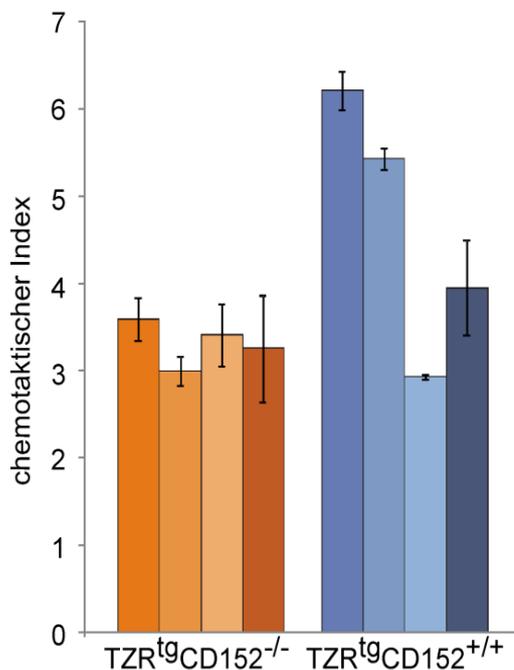


Abb. 18: Reduzierte Migration in CD152-kompetenten Zellen bei Inhibierung von Akt- und PI3`K-Signalwegen. CD4^+ T-Zellen aus $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{-/-}$ und $\text{TZR}^{\text{tg}}\text{CD152}^{+/+}$ Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter $\text{T}_{\text{H}1}$ -polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 4 Tagen sekundärer Stimulation wurden den Zellen 1 bzw. 10 μM Akt-Inhibitor II, PI3`K-Inhibitor Wortmannin (1 μM) bzw. das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid für 20 h zugesetzt. Nach 5 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen Ficoll-gereinigt und bei *in vitro* Chemotaxisversuchen auf ihre Migrationsfähigkeit zu 10 nM CCL4, untersucht (vergl. Abb. 5). Dargestellt ist der chemotaktische Index der CD4^+ $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen aus einem repräsentativen Experiment von zwei Versuchen.

Akt-Inhib. 1 μM	-	+	-	-	-	+	-	-
Akt-Inhib. 10 μM	-	-	+	-	-	-	+	-
PI3`K-Inhib.	-	-	-	+	-	-	-	+

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass CD152-Signale die Migration von $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen nicht nur über die Expression von Chemokinrezeptoren beeinflussen können, sondern auch Chemokin-induzierte Signalwege durch GRK-vermittelte Desensibilisierung und PI3`K-abhängige Akt-Aktivierung modulieren können.

3.11 CD152-Signale steuern die Lokalisierung von CD4⁺ T_H1-Zellen *in vivo*

Der Einfluss von CD152-Signalen auf die Migrationsfähigkeit von CD4⁺ T_H1-Zellen *in vitro* wurde in verschiedenen Versuchsansätzen nachgewiesen. In den folgenden Experimenten wurde diese Bedeutung von CD152-Signalen auch im komplexen System des Organismus *in vivo* bestätigt.

Zunächst wurde untersucht, ob T_H1-Zellen von TZR^{tg}CD152^{-/-}- und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren aufgrund der CD152-regulierten unterschiedlichen Migrationsfähigkeit *in vivo* in verschiedene Kompartimente des Körpers wandern. *In vitro* zu T_H1-Zellen polarisierte TZR^{tg}CD152^{-/-}- und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T-Zellen wurden nach sechs Tagen sekundärer Stimulation radioaktiv markiert und i.v. in kongene Empfängertiere transferiert. Nach 24 Stunden wurde die Radioaktivität - und damit die Lokalisierung der Zellen - in verschiedenen Organen analysiert. Die Summe der gemessenen Radioaktivität pro Maus war in Tieren, die CD152-kompetente Zellen erhalten hatten, und in Tieren, denen CD152-defiziente Zellen injiziert worden waren, vergleichbar. In der Leber, dem Organ des Abbaus apoptotischer Zellen, und im Serum, als Indikator für freie Radioaktivität aus defekten oder abgestorbenen Zellen, fanden sich keine Unterschiede in der Radioaktivität (Abb. 19). Damit kann ein ungleichmäßiger Zellverlust, z. B. durch Apoptose einer Zellpopulation, zwischen den experimentellen Gruppen ausgeschlossen werden. Die Verteilung der Radioaktivität von TZR^{tg}CD152^{-/-}- und TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen in Haut und Körperrest war vergleichbar. Die Lunge ist bei i.v.-Injektionen das erste Organ, das die Zellen mit dem Blutfluss passieren. Sie wies nach Transfer mit CD152-defizienten T_H1-Zellen erhöhte Radioaktivität auf (24,6 % CD152^{-/-}, 9,8 % CD152^{+/+}). In den peripheren Bluteukozyten (PBL) und im Darm war in den Tieren, die mit CD152-kompetenten Zellen transferiert worden waren, eine 1,3 bzw. 1,5-fach höhere Radioaktivität messbar als bei Tieren nach dem Transfer von CD152-defizienten Zellen. Erhöhte Radioaktivitätswerte waren auch in den sekundären lymphatischen Geweben nach dem Transfer CD152-kompetenter Zellen detektierbar. Mesenteriale und periphere Lymphknoten zeigten nach Transfer von TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen 2,4- bzw. 3,3-fach höhere Radioaktivität als nach Transfer von TZR^{tg}CD152^{-/-} CD4⁺ T_H1-Zellen. (Abb. 19).

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Lokalisierung von T_H1-Zellen auch *in vivo* in Anwesenheit von CD152-Signalen beeinflusst werden kann und die Positionierung in lymphatischen Geweben durch CD152-Engagement verbessert wird.

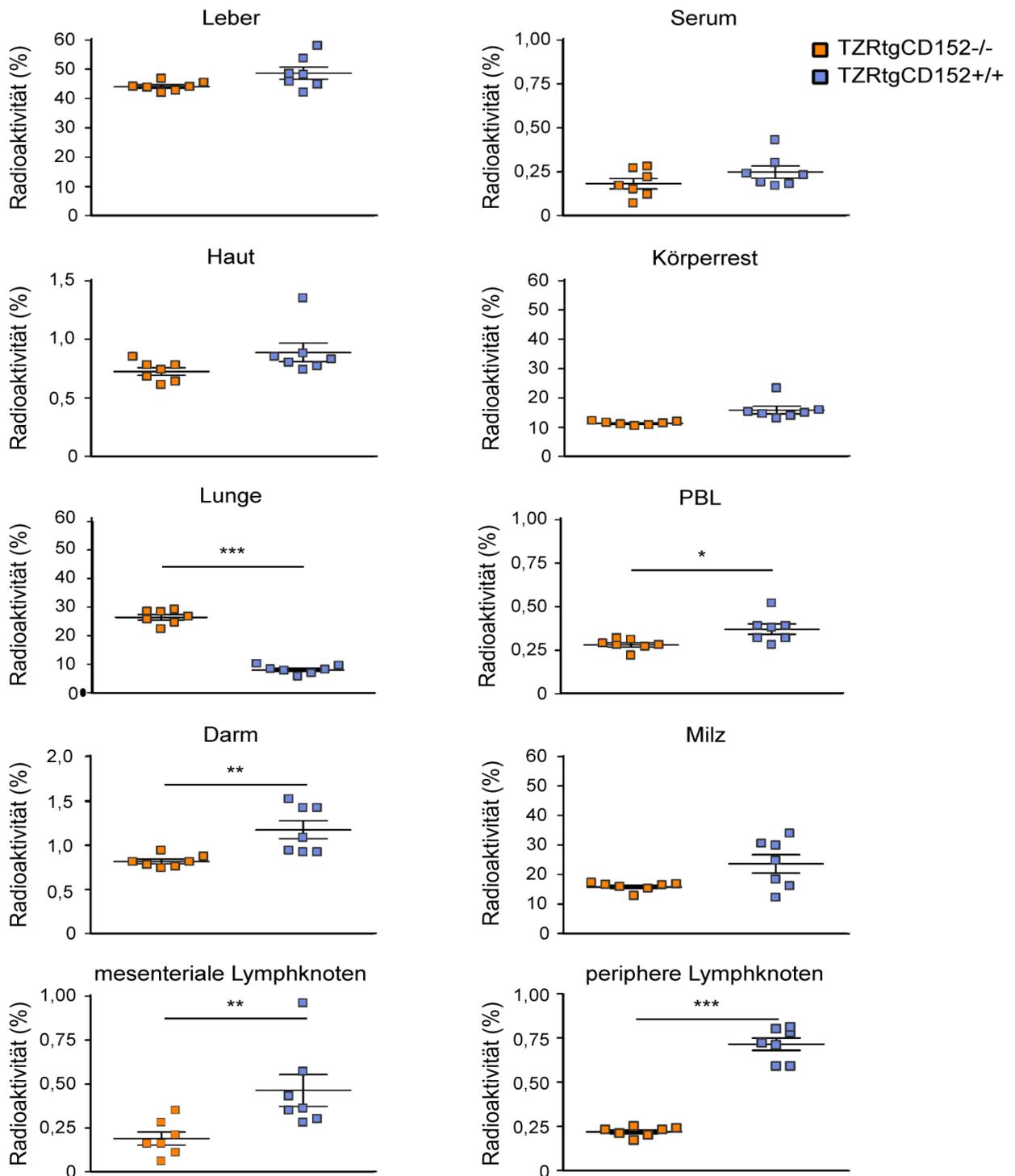


Abb. 19: Unterschiedliche Verteilung radioaktiv markierter CD152-defizienter und CD152-kompetenter T_H1-Zellen nach adoptivem Transfer. CD4⁺ T-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden Antigen-spezifisch mit OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1-polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 6 Tagen sekundärer Stimulation wurden die Zellen mit 20 µCi Chrom-51 radioaktiv markiert, tote Zellen durch Dichtezentrifugation entfernt und je 1x10⁶ Zellen in die Schwanzvene kongener Empfängertiere injiziert. 24 h später wurden die angegebenen Organe entnommen und mit einem γ-Strahlendetektor auf vorhandene Radioaktivität untersucht. Die statistische Auswertung gibt die wieder gewonnene Radioaktivität der einzelnen Organe bezogen auf die Gesamtradioaktivität jedes Tieres (100 %) an. Signifikanzen unter den Gruppen (n=7) wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. Dargestellt sind die Einzelwerte (mit Mittelwert und Standardabweichung) eines Versuches von zwei unabhängigen Experimenten.

3.12 CD152-Signale steigern die Migrationsrate pro-inflammatorischer T_H1-Zellen in entzündetes Gewebe

Eine Voraussetzung für effektive Immunreaktionen bei Infektionen ist die Fähigkeit von Zellen des adaptiven Immunsystems, an den Ort der Entzündung gelangen, d.h. Gefäße verlassen und in entzündetes Gewebe einwandern zu können. Die Migrationkapazität CD152-defizienter und CD152-kompetenter T_H1-Zellen in entzündetes Gewebe wurde in einem T-Zell-dominierten Entzündungsmodell (DTH, *delayed type hypersensitivity*) *in vivo* getestet.

In vitro generierte, radioaktiv markierte T_H1-Zellen von TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren (vergleiche Kapitel 3.11) wurden in Wildtypmäuse transferiert. Anhand der aktivierungsassoziierten Oberflächenmoleküle, CD69, CD44, CD25, CD62L, und der FN- γ -Produzenten wurde überprüft, ob die zu transferierenden T_H1-Zellen einen vergleichbaren Aktivierungsstatus hatten (Abb. 20 A). 24 Stunden nach Transfer der T_H1-Zellen wurde im Fuß eine lokale Entzündung durch die s.c. Injektion von OVA-Peptid in IFA (Inkomplettes Freund's Adjuvans) ausgelöst; der andere Fuß diente nach der PBS/IFA-Injektion als Kontrolle. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Lokalisierung der T_H1-Zellen in verschiedenen Organen und im entzündeten Gewebe anhand der wieder gefundenen Radioaktivität untersucht. Vergleichbare Radioaktivität fand sich 48 Stunden nach Transfer von TZR^{tg}CD152^{-/-} oder TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen in Leber- und Lungengewebe, Milz und Körperrest (Abb. 20 B) sowie in Darm und Haut wieder (Abb. 20 B). Die Lymphknoten des Mesenteriums und der Axillae (LK) aus einem Tier wurden gemeinsam untersucht. Sie wiesen in den Tieren nach Transfer mit CD152-kompetenten T_H1-Zellen zweifach höhere Radioaktivitätswerte auf als nach Transfer CD152-defizienter Zellen (Abb. 20 A). In den ableitenden poplitealen und inguinalen Lymphknoten der Füße nach Kontroll-Injektion mit PBS wurde vergleichbare Radioaktivität nach Transfer der verschiedenen Zellpopulationen detektiert (CD152^{-/-} 0,03 %, CD152^{+/+} 0,04%). Dagegen war in den ableitenden Lymphknoten der Füße, in denen eine Entzündung ausgelöst worden war, signifikant höhere Radioaktivität nach Transfer mit TZR^{tg}CD152^{+/+} CD4⁺ T_H1-Zellen (0,14 %) verglichen mit CD152-negativen T-Zellen messbar (0,06 %)(Abb. 20 B). Die Radioaktivität in peripheren Blutleukozyten (PBL) spiegelte die vermehrte Lokalisierung CD152-defizienter Zellen (0,88 %) gegenüber CD152-kompetenten Zellen (0,34 %) in diesem Kompartiment wieder.

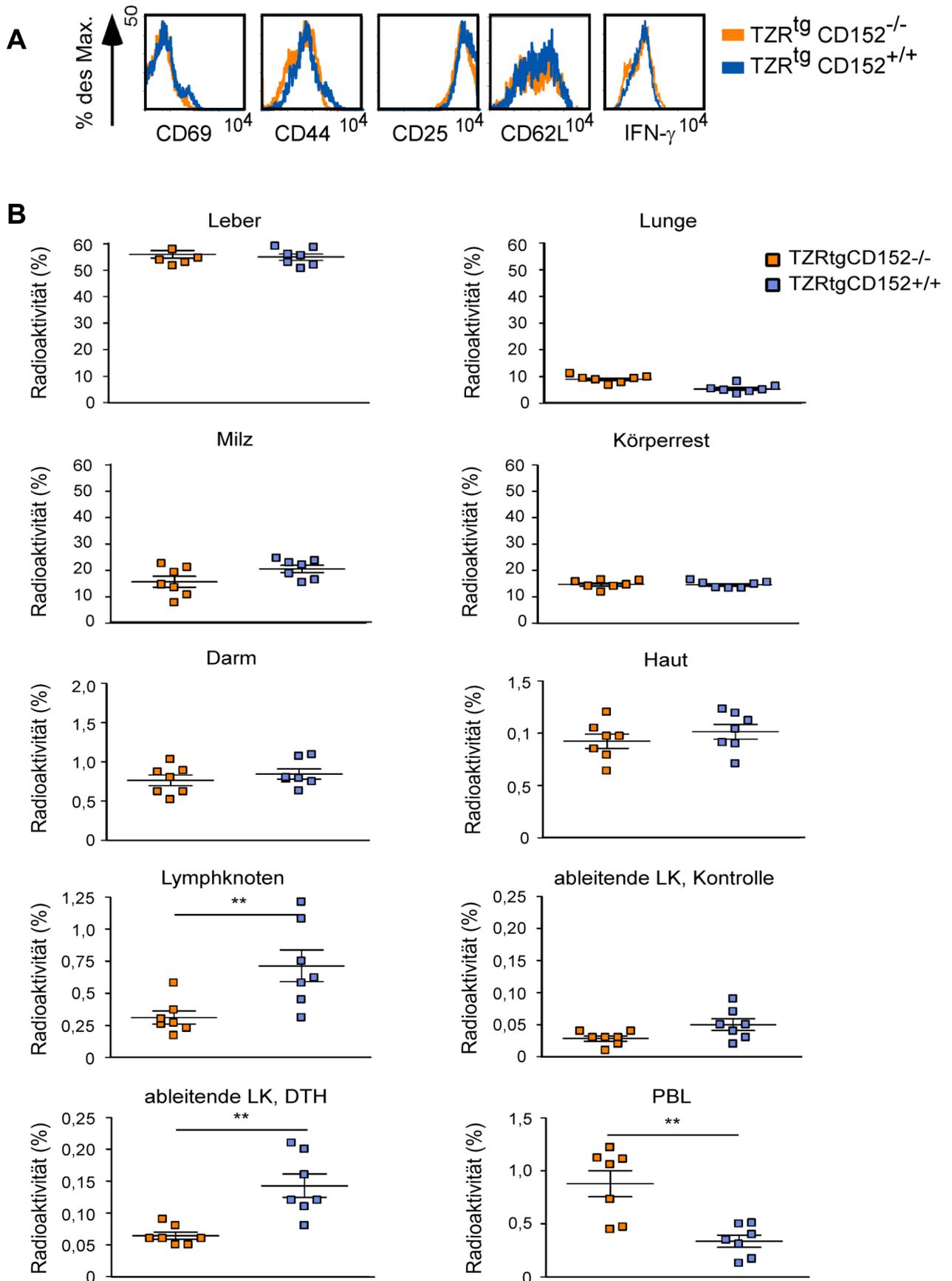


Abb. 20: A Vergleichbarer Aktivierungsstatus transferierter T_H1 -Zellen. $CD4^+$ T-Zellen aus $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ und $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ Tieren wurden Antigen-spezifisch mit 10 μ g/ml OVA-Peptid und T-Zell-depletierten APZ unter T_H1 -polarisierenden Bedingungen primär und sekundär stimuliert. Nach 5 Tagen sekundärer Stimulation wurde die Expression von Oberflächenmolekülen auf $CD4^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Für die Untersuchung der IFN- γ -Produktion wurden die Zellen zuvor für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert, fixiert und permeabilisiert (s. Abb. 11A). **B Verteilung radioaktiv markierter transferierter T_H1 -Zellen im Entzündungsfall.** 1×10^6 polarisierte T_H1 -Zellen aus $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ und $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ Tieren wurden nach 5 Tagen sekundärer Stimulation radioaktiv markiert und i.v. in Empfängertiere transferiert (s. Abb. 19). 24 h nach Transfer wurde eine DTH-Entzündung durch die subkutane Injektion von OVA-Peptid in IFA (Inkomplettes Freund's Adjuvans) im linken Fußballen des Tieres ausgelöst, der rechte Fuß wurde als Kontrolle mit PBS/IFA behandelt. 48 h nach Transfer (24 h nach Auslösung der DTH) wurden die Organe entnommen und die Radioaktivität detektiert (s. Abb. 19). Dargestellt sind die Einzelwerte (mit Mittelwert und Standardabweichung) eines Versuches von zwei unabhängigen Experimenten mit je 7 Tieren/Gruppe. LK, Lymphknoten (axilläre und mesenteriale); abl. LK Kontrolle, ableitende (popliteale und inguinale Lymphknoten)nach PBS/IFA-Injektion; abl. LK DTH, (popliteale und inguinale) ableitende Lymphknoten des Fußes nach OVA/IFA-Injektion; PBL, periphere Blutleukozyten.

Zusätzlich wurden im DTH-Entzündungsmodell die Pfoten der Empfängertiere vor und 48 Stunden nach dem Transfer von $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ oder $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ $CD4^+$ T_H1 -Zellen vermessen (Abb. 21 A). Schwellungen des Gewebes sind ein Charakteristikum von Entzündungen und korrelieren mit der Ansammlung verschiedener immunreaktiver Zellen im Gewebe. Nach dem Transfer von $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ $CD4^+$ T_H1 -Zellen erhöhte sich der Fußdurchmesser von 1,4 mm vor Behandlung sowohl im Kontrollfuß (1,9 mm) als auch im Fuß nach Auslösung der DTH-Reaktion (2,27 mm). Dagegen erhöhte sich der Fußdurchmesser der Kontrollseite nach dem Transfer von $CD152$ -kompetenten T_H1 -Zellen nur leicht auf 1,69 mm. Die Schwellung durch die Kontrollsubstanz PBS/IFA war damit nach dem Transfer von $CD152$ -kompetenten T_H1 -Zellen signifikant geringer als nach dem Transfer von $CD152$ -defizienten T_H1 -Zellen. Die DTH-Reaktion löste in den Tieren, die $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ $CD4^+$ T_H1 -Zellen injiziert bekamen, einen deutlichen Anstieg der Schwellung auf 2,66 mm auf. Dies entspricht einer hochsignifikanten Erhöhung gegenüber der Schwellung nach $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ $CD4^+$ T_H1 -Zelltransfer (Abb. 21 A).

Um die Einwanderung proinflammatorischer T_H1 -Zellen in entzündetes Gewebe zu analysieren, wurden nach Auslösung der DTH-Reaktion neben den Organen auch die Füße der Empfängertiere auf enthaltende Radioaktivität untersucht. (Abb. 21 B). Das Verhältnis der Radioaktivität im entzündeten Fuß zum Kontrollfuß gibt Auskunft über die Rekrutierung von T_H1 -Zellen in Abhängigkeit vom Antigen (OVA-Peptid). Die stationäre Lokalisierung von T_H1 -Zellen im entzündeten Gewebe war nach dem Transfer von $TZR^{tg}CD152^{+/+}$ $CD4^+$ T_H1 -Zellen zweifach und damit signifikant höher als nach Transfer von $TZR^{tg}CD152^{-/-}$ $CD4^+$ T_H1 -Zellen ($CD152^{-/-}$ 1,5, $CD152^{+/+}$ 3,2); (Abb. 21 B).

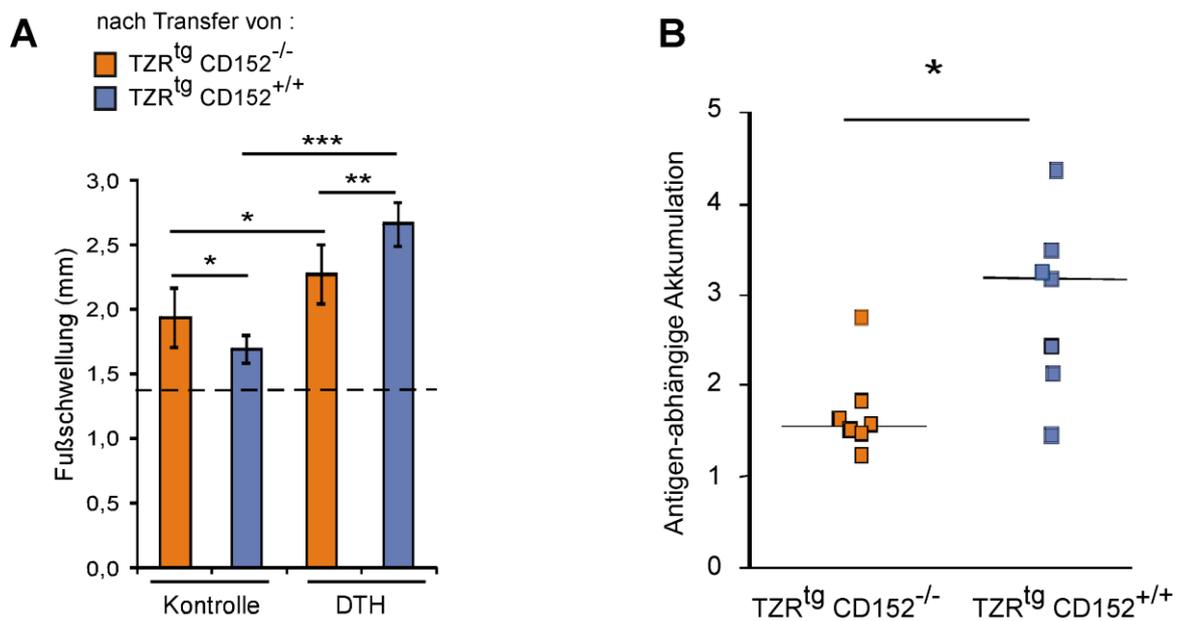


Abb. 21: Die Antigen-abhängige Rekrutierung immunreaktiver Zellen in entzündetes Gewebe ist nach Transfer mit CD152-kompetenten T_H1-Zellen erhöht. Polarisierte T_H1-Zellen aus TZR^{tg}CD152^{-/-} und TZR^{tg}CD152^{+/+} Tieren wurden nach 5 Tagen sekundärer Stimulation radioaktiv markiert und i.v. in Empfängertiere transferiert (wie in Abb. 19). 24 h nach Transfer wurde eine DTH durch die subkutane Injektion von OVA-Peptid in IFA im linken Fußballen des Tieres ausgelöst, der rechte Fuß wurde als Kontrolle mit PBS/IFA behandelt. **A** Die Antigen-abhängige Akkumulation stellt das Verhältnis der Radioaktivität des OVA/IFA-injizierten Fußes zum Kontrollfuß dar. **B** Vor dem adoptiven Zelltransfer und 24 h nach der Injektion der Peptid/IFA-Lösung wurden die Füße der Tiere mit einem Außentaster vermessen. Die gestrichelte Linie markiert den durchschnittlichen Fußdurchmesser vor dem Transfer. Signifikanzen unter den Gruppen (n=7) wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. Die repräsentativen Daten von einem aus zwei Versuchen sind dargestellt.

Diese Ergebnisse belegen die Fähigkeit von T_H1-Zellen, CD152-vermittelt in lymphatische Organe als zentrale Orte der Immunreaktionen zu gelangen. Die Einwanderung pro-inflammatorischer T_H1-Zellen in entzündetes Gewebe wird in Anwesenheit von CD152-Signalen erhöht und die Ansammlung weiterer immunreaktiver Zellen begünstigt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Expression und der Signale des kostimulatorischen Moleküls CD152 für die Migrationsfähigkeit von CD4⁺ T-Zellen untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die funktionelle Chemotaxis zu homöostatischem CCL19 und inflammatorischem CCL4 durch die Expression von CD152-Proteinen auf CD4⁺ T-Zellen erhöht wurde. CD152-Signale regulierten das chemotaktische Migrationsverhalten pro-inflammatorischer T_H1-Zellen nicht nur bei *in vitro* Chemotaxisversuchen, sondern die verbesserte Migrationskapazität wurde auch bei *in vivo* Experimenten bestätigt. Die Migration von T_H1-Zellen zu Lymphknoten und in entzündetes Gewebe war nach adoptivem Transfer in den Empfängertieren durch das Engagement von CD152 erhöht. Die gesteigerte Chemotaxis CD152-kompetenter T_H1-Zellen im Vergleich mit CD152-defizienten T_H1-Zellen zu dem inflammatorischen Chemokin CCL4 beruhte auf einer verstärkten Expression des Chemokinrezeptors CCR5 und einer differentiellen, PI3'K-abhängigen Aktivierung des Zielmoleküls Akt.

4.1 Die Bedeutung der kostimulatorischen Moleküle CD152 und CD28 bei der Migration von CD4⁺ T_H-Zellen

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von CD152-Signalen für die Erhöhung der gerichteten Migration von primären T-Zellen im Zusammenspiel mit TZR- und CD28-Signalen über die genetische und serologische Blockade von CD152-Molekülen nachgewiesen (s. Kapitel 3.2). Auch die Vermittlung definierter CD152-Signale über Mikropartikel im Kontext mit TZR- und CD28-Aktivierung löste in aktivierten Zellen eine gesteigerte Chemotaxis der T_H1-Zellen aus, die ein CD152-Signal erhalten hatten, im Vergleich zu den T_H1-Zellen, denen nur TZR- und CD28-Signale gegeben wurden (s. Abb. 7 A).

Bisherige Untersuchungen zu den Auswirkungen der Kostimulation auf die Migration von T-Zellen zeigen vor allem den positiven Einfluss des kostimulatorischen CD28-Moleküls. Die Abwesenheit von CD28-Signalen durch die genetische Defizienz von CD28- bzw. CD80/CD86-Molekülen führte zur ineffizienten Lokalisierung von T-Lymphozyten in nicht-lymphatischen Geweben mit Antigenpräsentation [243–245]. Auch wurde die Anwesenheit von CD28-Signalen bei *in vivo* Experimenten als Voraussetzung einer verbesserten transendothelialen und Integrin-vermittelten Migration von Antigen-erfahrenen T-Zellen beschrieben [244]. Da CD152-Moleküle als potentielle Gegenspieler zu CD28-Molekülen oft

konträre Effekte der CD28-Signale bewirken, ließe sich vermuten, dass CD152-Signale auch die Migration der T-Zellen gegenteilig regulieren und damit zu verminderter Migrationsfähigkeit führen. Aus den Daten, die auf eine verbesserte T-Zell-Migration durch CD28-Signale hindeuten [243–245], lassen sich keine Rückschlüsse auf den Einfluss von CD152-Signalen ziehen, da die Aktivierung der T-Zellen in diesen Studien durch anti-CD28-Antikörper erfolgte. Dabei bleibt der Einfluss von CD152-Signalen auf die Migration unberücksichtigt, da CD152-Moleküle erst nach optimaler Aktivierung über den TZR und kostimulatorische CD28-Moleküle exprimiert werden [45].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen dagegen nach, dass auch kostimulatorische Signale der CD152-Moleküle die Migrationsfähigkeit von T-Zellen verbessern können. Insbesondere die zielgerichtete, Chemokin-induzierte Migration wird über CD152-Signale gesteigert. Dies wurde u. a. deutlich in CD152-defizienten CD4⁺ T_H1-Zellen, die erst nach der Rekonstitution von CD152-Proteinen über die retrovirale Transduktion der kodierenden cDNA, eine erhöhte Migration zu Chemokinen zeigten (s. Abb. 7 B). CD152-Signale führten auch zur verstärkten Lokalisierung von T-Zellen in lymphatischem und entzündetem Gewebe (s. Abb. 19 und Abb. 20 B). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, die den positiven Einfluss der CD152-Signale auf die Migrationsfähigkeit der T-Zellen belegen, wurde ein inhibierender Effekt von CD152-Signalen auf die Migration von T-Zellen bei *in vivo* Experimenten dargestellt [244]: Es wurde gezeigt, dass CD152-vermittelte Signale die TZR-abhängige Gewebeeinfiltration von T-Zellen verhindern [244]. Allerdings ist die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Auswirkungen von CD152-Signalen auf die Migration von T-Zellen aufgrund verschiedener experimenteller Ansätze begrenzt. So wurden die inhibierenden Effekte von CD152-Signalen auf die Migration in monospezifischen, cytotoxischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen [244]. Diese intraperitoneal injizierten CD8⁺ T-Zellen wiesen nur eine geringe konstitutive Expression von CD152-Proteinen auf. In dieser Arbeit wurde dagegen die CD152-vermittelte Migrationsfähigkeit von primären CD4⁺ T_H-Zellen nach i.v. Injektion erhöht (s. Abb. 19 und Abb. 20 B). Antigen-erfahrene CD4⁺ T_H-Zellen, die in den Experimenten dieser Arbeit durch die wiederholte Antigengabe während der *in vitro*-Aktivierung generiert wurden, zeigen eine erhöhte Expression von CD152-Rezeptoren [24]. Korrelierend mit der gesteigerten Expression verstärken CD152-Signale die funktionellen Effekte auf die Proliferation und Zytokinproduktion in Antigen-erfahrenen T-Zellen [246] und regulieren vermutlich auch die Migration vermehrt. Außerdem wurde in dieser Arbeit der Einfluss von CD152-Signalen auf die Chemokin-induzierte gerichtete Chemotaxis analysiert. Auf einer zielgerichteten Migration kann die Gewebeeinfiltration von T-Zellen, die sich bei CD152-exprimierenden, monospezifischen CD8⁺ T-Zellen vermindert zeigte [244], jedoch nicht beruhen, da die CD8⁺

T-Zellen weder über die für gerichtete Migration notwendige Selektinexpression noch über die Expression von Chemokinrezeptoren verfügen [244]. Die Vermittlung kostimulatorischer Signale beim Transfer monospezifischer CD8⁺ T-Zellen in Empfängertiere, die durch die gemeinsame Injektion der Zellen mit entweder anti-CD28- oder mit anti-CD152-Antikörpern erfolgte [244], könnte den Aktivierungszustand der CD8⁺ T-Zellen beeinflussen. Daher ist anzunehmen, dass die Lokalisierung der CD8⁺ T-Zellen in den Geweben in diesen Experimenten von aktivierungsinduzierten Mechanismen wie die Integrin-vermittelte Adhäsion bestimmt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern die Einsicht in die Rolle der CD152-Signale für die Mobilität von T-Zellen. Bisher war demonstriert worden, dass CD152-Engagement direkt und über die TZR-Kostimulation zur Ansammlung von LFA-1 Integrinen auf der Oberfläche von CD152-exprimierenden T-Zellhybridomen und primären murinen T-Zellen sowie zu erhöhter Adhäsion an ICAM-1-Liganden führt [58]. Diese Regulierungen der T-Zell-Mobilität durch CD152-Signale finden auf der Ebene der Adhäsion statt. Ergänzend dazu wird hier erstmals demonstriert, dass Signale des kostimulatorischen Rezeptors CD152 auch die zielgerichtete Chemokin-vermittelte Migration von CD4⁺ T-Zellen erhöhen können. Da bei der genetischen und serologischen Blockade von CD152-Proteinen keine CD152-Moleküle für Bindungen mit den Liganden CD80 bzw. CD86 auf den APZ zur Verfügung stehen, hätten möglicherweise vermehrte Interaktionen zwischen CD28-Rezeptoren und CD80- bzw. CD86-Molekülen hervorgerufen werden können, so dass die Migration dadurch verändert wird. Die Experimente, in denen CD28-Signale in den Migrationsversuchen in An- und Abwesenheit definierter CD152-Signale konstant gehalten wurden (s. Abb. 7 A), zeigen eindeutig, dass die Reduktion der T_H1-Zell-Migration kein Effekt verstärkter CD28-Interaktionen ist, sondern auf fehlenden CD152-Signalen beruht. Dies lässt den Schluss zu, dass die durch CD152-Signale induzierte gesteigerte Migrationsfähigkeit nicht lediglich auf kompetitiver Verhinderung der CD28-Signale basiert, sondern auch in Anwesenheit von CD28-Signalen aktiv durch CD152-Signale moduliert werden kann.

4.2 Der Einfluss der CD152-Expression auf die Regulation der Migration

Eine starke Aktivierung der T-Zellen konnte die gerichtete Migration von CD152-kompetenten T_H1-Zellen deutlich steigern. CD152-kompetente T_H1-Zellen, die mit hohen Antigenkonzentrationen in der primären und sekundären Stimulation stimuliert worden waren, zeigten eine bessere Migrationsfähigkeit als CD152-kompetente T_H1-Zellen, die mit niedrigeren Antigenkonzentrationen aktiviert worden waren (s. Abb. 8). Die erhöhte Avidität des TZR durch die hohe Antigenendosis führte ausschließlich in CD152-kompetenten T_H1-

Zellen zu einer gesteigerten Migration zu den Chemokingradienten, während die Migration von CD152-defizienten T_H1-Zellen nicht durch hohe Antigenkonzentrationen zu beeinflussen war. Eine erhöhte migratorische Kapazität zeigte sich auch in CD152-kompetenten T_H1-Zellen, die mit DZ aktiviert worden waren, im Vergleich mit CD152-kompetenten T_H1-Zellen, die in Anwesenheit von B-Zellen stimuliert wurden (s. Abb. 12). Bekannt ist, dass die stabile Expression der CD152-Proteine auf der Zellmembran von der Stärke der TZR-Antigen-Interaktion abhängig ist [30,32]. Auch über die Zellart, die zur Antigenpräsentation eingesetzt wird, kann die Oberflächenexpression von CD152-Proteinen *in vitro* manipuliert werden [240]: Präsentieren reife DZ als professionelle APZ die Antigene für CD4⁺ T-Zellen, erhalten die T-Zellen optimale Signale zur Stimulation. Im Vergleich mit T-Zellen, die Antigene von aktivierten B-Zellen präsentiert bekamen, zeigen DZ-stimulierte CD4⁺ T-Zellen eine vermehrte Oberflächenexpression von CD152-Proteinen [240]. Außerdem müssen CD152-Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen präsent sein, um die inhibitorischen Funktionen zur Begrenzung von Immunreaktionen ausüben zu können [26]. Es ist anzunehmen, dass auch die in dieser Arbeit nachgewiesene CD152-vermittelte, gesteigerte migratorische Fähigkeit der T_H1-Zellen durch eine erhöhte Expression der CD152-Moleküle auf der Zellmembran hervorgerufen wird. Die Expression der CD152-Rezeptoren korreliert mit der CD152-vermittelte Migration der T_H1-Zellen und zeigt sich damit auch funktionell relevant.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die CD152-Expression von der Stärke der Stimulation und der Art der APZ abhängig ist, und unterstreichen die Bedeutung der CD152-Signale für die frühe Aktivierungsphase der T-Zellen. Zusätzlich zu den CD152-Effekten, die über die verminderte NF-AT-Translokalisierung und IL-2-Transkription zur Inaktivierung der T-Zellen führen, können CD152-Signale schon zu Beginn der Stimulation die Migrationsfähigkeit beeinflussen und damit die Lokalisierung der T-Zellen steuern. Mit diesen Ergebnissen wird erneut demonstriert, dass CD152-Signale die T-Zellen nicht grundsätzlich durch inhibitorische Mechanismen inaktivieren. Vielmehr trägt die CD152-vermittelte positive Regulierung der gerichteten Chemotaxis von T-Zellen dazu bei, die Immunantworten entscheidend zu beeinflussen, indem sie die Positionierung der T-Zellen in Lymphknoten und an Infektionsorten fördert.

4.3 Die Relevanz von CD152-Signalen für die Adhäsion und die Chemotaxis von T-Zellen

Auf den ersten Blick scheinen die Ergebnisse der gesteigerten gerichteten Migration durch CD152-Signale im Gegensatz zu den massiven Lymphozyteninfiltraten in verschiedenen Organen CD152-defizienter Mäuse zu stehen [38,62]. In diesen Studien wurde eine starke

Expansion der CD4⁺ T-Lymphozyten beobachtet. Sie überfluten den Organismus und werden möglicherweise aus Platzmangel in alle Organe gedrängt. In diesem Fall würden die Zellen die verschiedenen Organe infiltrieren, ohne dass notwendigerweise eine gerichtete Migration dafür verantwortlich wäre. Alternativ könnten die T-Zellen im Gewebe zurückgehalten werden, denn auch das Verlassen peripherer Gewebe und der Eintritt in afferente Lymphgefäße sind nicht zufällig, sondern werden über Chemokinrezeptoren reguliert. Der Chemokinrezeptor CCR7 ist für den Gewebeaustritt von B-Zellen, CD8⁺- und CD4⁺ T-Zellen erforderlich [153,154]. Bei der Aktivierung von Lymphozyten wird die Expression von CCR7 gesenkt. Entsprechend zeigten auch T-Zellen aus CD152-defizienten Tieren, bei denen aktivierende CD28-Signale nicht durch CD152-Signale gegengesteuert werden, kaum CCR7-Expression (s. Abb. 13). Gelangen aktivierte CD152-defiziente Zellen eher durch zufällige Infiltration als durch gerichtete Migration in nicht-lymphatische Gewebe, könnten die expandierenden Zellen aus Mangel an CCR7 dort zurückgehalten werden.

Die starke Aktivierung der Lymphozyten könnte in CD152-defizienten Tieren ohne inhibitorisch-wirkende CD152-Signale auch zu einer unkontrollierten Expression von Chemokinrezeptoren führen. Die normalerweise existierende Hierarchie der Signale, in der Signale der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR3 nach der Ligandenbindung TZR-induzierten Signalen übergeordnet sind und immunsuppressive Funktion haben [247], könnte in diesem Fall aufgehoben sein. TZR-Signale führen zur Aktivierung von Integrinen [248] und fördern durch die Aktivierung von Makrophagen die Präsentation von Integrinliganden. So könnte in stark aktivierten CD152-defizienten Zellen die Integrin-vermittelte Adhäsion an Geweben mit Integrinligandenexpression und an Komponenten der extrazellulären Matrix erhöht werden. Die Ursache einer folgenden Organinfiltration wären bei CD152-defizienten Tieren aktivierungsinduzierte Adhäsionsmechanismen und keine Chemokin-induzierte, zielgerichtete Migration von T-Zellen.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Migrationsfähigkeit und Lokalisierung der T-Zellen in CD152-defizienten Tieren im Vergleich mit den Experimenten von CD152-defizienten Zellen *in vitro* und nach adoptivem Transfer in Wildtyptiere in der vorliegenden Arbeit könnte darin liegen, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Bedeutung der CD152-Signale bei der Migration unpolarisierter bzw. T_H1-differenzierter CD4⁺ T-Zellen konzentrieren. Unter den Bedingungen der T-Zellaktivierung mit starkem Stimulus bzw. T_H1-polarisierenden Zusätzen, die zu verbesserter gerichteter Migration CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von CD152-Signalen führt, konnten sich weder T_H17-Zellen noch IL-4-produzierende T_H2 Zellen entwickeln (s. Abb. 10). T_H2-Zellen bilden jedoch die vorherrschende T-Zellsubpopulation in CD152-defizienten Mäusen, denn das Fehlen von CD152-Signalen führt in der frühen Aktivierungsphase der T-Zellen zu einer Entwicklung mit

T_H2-Phänotyp [83,84]. Die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, T-bet versus GATA-3, die bei der Differenzierung zu T-Zell-Subpopulationen eine Rolle spielen, führen dabei auch zur Expression unterschiedlicher Chemokinrezeptoren. Wenn die Infiltration aktivierter T-Zellen in CD152-defizienten Tieren nicht nur durch Adhäsionsmoleküle vermittelt wird, sondern auch zielgerichtet durch den Einfluss von Chemokinrezeptoren erfolgt, so wären wahrscheinlich eher T_H2-assoziierte Rezeptoren wie CCR4 und CCR8 beteiligt. Der in dieser Arbeit untersuchte homöostatische Rezeptor CCR7 wird im Verlauf der Differenzierung nur auf niedrigem Niveau exprimiert [139] und der T_H1-assoziierte Rezeptor CCR5, dessen Expression durch IFN- γ induziert wird, wäre nicht präsent. Inwieweit die Regulation der zielgerichteten Migration durch CD152-Signale auch auf andere Chemokinrezeptoren in einem z. B. IL-4-geprägten Milieu übertragbar ist, muss in weiteren Studien geklärt werden. Da sich die Regulierung der CD152-vermittelten Migration nicht abhängig von IFN- γ als wichtigstes T_H1-Zytokin zeigte (s. Abb. 11), lässt sich vermuten, dass die gesteigerte Migration in Anwesenheit von CD152-Signalen nicht auf T_H1-Zellen festgelegt ist. Bei T_H2-Zellen könnte der CD152-vermittelte Effekt der gerichteten Migration sogar noch verstärkt auftreten, da T_H2-Zellen im Vergleich mit T_H1-Zellen nach der Aktivierung vermehrt CD152-Rezeptoren exprimieren [48].

4.4 Differentielle Regulation der Chemokinrezeptorexpression auf CD4⁺ T-Zellen durch CD152-Signale

Die verstärkte Chemotaxis von CD152-kompetenten T_H1-Zellen zu den Liganden der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 in Anwesenheit von CD152-Engagement korrelierte in funktionellen Migrationsversuchen mit der erhöhten Rezeptorexpression von CCR5 und CCR7 (s. Abb. 6 B und Abb. 13). Diese Ergebnisse bestätigen Daten aus humanen CD4⁺ T-Zellen, die eine verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR5 unter dem Einfluss von CD152-Signalen zeigen [229]. Die kostimulatorischen CD152-Signale bewirken dabei eine Hemmung der CD28-vermittelten Reduktion der CCR5-Expression [229]. Es ist wahrscheinlich, dass die erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren auch die Ursache der erhöhten Migration ist. Es bleibt aber fraglich, ob die Regulierung der Expression der einzige Mechanismus zur Steuerung der Migration ist. So zeigte die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 keine Parallelen zur funktionellen Migration der T_H1-Zellen. Trotz vergleichbarer Expression auf CD152-positiven und CD152-defizienten CD4⁺ T_H1-Zellen wurde eine gesteigerte Migration in Anwesenheit von CD152-Signalen gemessen (s. Abb. 6 B und Abb. 13 A). Die erhöhte Chemotaxis der CD152-positiven T_H1-Zellen zu

dem Liganden CXCL12 muss durch andere Faktoren reguliert werden als nur über die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors. Die von der Funktionalität abweichende Expression von CXCR4 in Lymphozyten ist schon früher gezeigt worden [241,249–251]. Die Chemokinligandenbindung löst in reifen CD19⁺ PBL keinen Calcium-Einstrom aus, obwohl CXCR4 in allen Reifestadien der B-Zellen konstitutiv exprimiert wird. Stattdessen aktiviert die Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktion MAPK-Wege und induziert dadurch die Internalisierung des Rezeptors [241,252].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen außerdem, dass T_H1-polarisierte Zellen zu späten Zeitpunkten nach Aktivierung zu dem CCR7-Liganden CCL19 migrieren können (z. B. Abb. 6 B). Sie ergänzen damit funktionelle Migrationsanalysen, in denen dargestellt wurde, dass *in vivo* polarisierte murine T_H1- und T_H2-Zellen auf den CCR7-Liganden CCL21 reagieren können [253]. Unsere Daten veranschaulichen, dass auch die Expression des Rezeptors CCR7 nicht immer die Migrationsbereitschaft der Zellen widerspiegelt. Bisher war angenommen worden, dass T_{EFF}-Zellen nicht effizient zu CCL21 und CCL19 migrieren können, da die Expression des Rezeptors CCR7 auf der Oberfläche von humanen T_{EFF}-Zellen nicht nachweisbar war. Die Expression von CCR7 wird im Verlauf der Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse naiver CCR7⁺ T-Zellen für 1-2 Tage gesteigert und ist danach nur auf der Oberfläche von T_{CM}-Zellen detektierbar [139]. Die Diskrepanz zwischen Expression und Funktionalität könnte darauf beruhen, dass der Rezeptor zwar funktionell auf der Zellmembran von T_H1-Zellen vorliegt, aber durch schnelle Internalisierungs- und Recyclingprozesse schwer nachweisbar ist und die Expression von CCR7 auf differenzierten Zellen unter dem Detektionslimit der Durchflusszytometrie liegt. Aufgrund der übergeordneten Hierarchie von CCR7 über TZR-Signale und andere Chemokinrezeptoren [247] könnten geringste Mengen von CCR7 ausreichend sein, um die Migration nach Ligandenbindung auszulösen. Die limitierte Detektierbarkeit von CCR7 behinderte auch die phänotypische Charakterisierung der migrierten T-Zellen. Während die Expression von CCR5 von dem T_H1-polarisierenden Faktor IL-12 abhängig ist [242], ist CCR7 auf differenzierten T_H1-Zellen nicht nachweisbar [139]. Die gleichzeitige Anwesenheit von CCR5 und CCR7 auf CD4⁺ T_H1-polarisierten Zellen zum Zeitpunkt der Migrationsversuche wurde daher durch funktionelle Migrationsanalysen gezeigt (s. Abb. 14).

Die Divergenz der Rezeptorexpression und -funktionalität, die sich in dieser Arbeit auch bei dem Chemokinrezeptor CXCR4 zeigte, kann verschiedene Ursachen haben. RGS-Proteine (*regulators of G-protein signaling*), posttranslationale Modifizierung der signalvermittelnden Tyrosinreste oder Desensibilisierung über antagonistische Chemokinliganden können trotz nachweisbarer Chemokinrezeptorexpression die Reaktivität beeinflussen [241,254–256]. So wurde für den Chemokinrezeptor CCR5 dokumentiert, dass der ligandengebundene

Rezeptor den Recyclingweg über endosomale Kompartimente mehrfach passieren kann, ohne dass dies notwendigerweise zur Dissoziation des Liganden führt [192]. Diese Tatsache könnte zu funktionell desensibilisierten Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche führen und macht deutlich, dass die Aussagen über die Expression von Chemokinrezeptoren für die Migrationskapazität limitiert sind. Durchflusszytometrische Analysen der Expression können zwar als Hinweis für unterschiedliches Migrationsverhalten genommen werden, sind jedoch ohne funktionelle Ergebnisse, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurden, nicht ausreichend.

4.5 CD152-Signale regulieren die Migration über direkte Signale

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aktivierungsstatus der T-Zellen in An- und Abwesenheit von CD152-Signalen über aktivierungsassoziierte Oberflächenmoleküle der T_H1 -Zellen kontrolliert (s. Abb. 20 A). Die Aktivierungsstärke der T-Zellen kann die Expression von Chemokinrezeptoren und auch die Signalleitung der Rezeptoren verändern [257]. Entsprechend können kostimulatorische CD28- und CD152-Signale über die Stärke der Aktivierung entscheidenden Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen nehmen. Obwohl CD152-Signale die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen inhibieren können [237], zeigten die Expressionen der aktivierungsassoziierten Moleküle CD69, CD44, CD25 und CD62L bei starker Aktivierung im T_H1 -Milieu einen ähnlichen Verlauf. Die analoge Entwicklung der IFN- γ -Zytokinproduzenten in CD152-positiven und CD152-defizienten $CD4^+$ T-Zellen unter den polarisierenden T_H1 -Bedingungen (s. Abb. 11 A) veranschaulicht die Vergleichbarkeit der T_H1 -Differenzierung. Es ist daher wenig wahrscheinlich, dass Unterschiede im Aktivierungsstatus zwischen CD152-positiven und CD152-defizienten Zellen für die gesteigerte CD152-vermittelte Migration verantwortlich sind.

Die direkte Beteiligung TZR-vermittelter Signale für die T-Zellmobilität wird durch die Beobachtung gestützt, dass TZR-Signale die Aktivität von Integrinen erhöhen und migrierende T-Zellen immobilisieren können [248]. Die Antigen-abhängige TZR-Aktivierung ist bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis für die Lokalisierung, Akkumulation und Retention von T-Zellen im Gewebe und damit für den Krankheitsgrad verantwortlich [258]. Obwohl die Intervention von CD152-Signalen mit proximalen TZR-Signalen zur Veränderung des Aktivierungszustandes der T-Zellen führt [259], kann trotzdem eine indirekte, aktivierungsabhängige Wirkung der CD152-Signale auf die Migration weitgehend ausgeschlossen werden. Denn zusätzlich zu der vergleichbaren Expression der aktivierungsassoziierten Moleküle bewiesen die Experimente, in denen CD152-Signale über antikörperbeschichtete Mikropartikel gegeben wurden, dass die Migration auch bei starker Aktivierung der Zellen durch CD152-Engagement verändert werden kann (s. Abb. 7A).

Die in dieser Arbeit dargestellte neue Funktion der CD152-Signale, die zu verstärkter Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 und erhöhter gerichteter Migration führt (s. Abb. 13 und Abb. 7 A), verdeutlicht, dass das kostimulatorische Molekül CD152 an der positiven Regulierung von Zellprozessen beteiligt ist. Zusätzlich zu der bekannten Steigerung der Expression und Aktivierung von Molekülen, die dem Schutz vor Apoptose dienen, z. B. Bcl-2, FOXO3 und PI3'K [48], können CD152-Signale die Chemokin-vermittelte gerichtete Zellmobilität fördern. Die Ergebnisse ändern damit die klassische Betrachtungsweise von CD152-Rezeptoren als negativ-regulatorische Moleküle, die T-Zellfunktionen generell limitieren und Immunantworten beenden. Stattdessen zeigt sich, dass CD152-Signale direkt an der Steuerung der Migration von Effektor-T-Zellen *in vitro* und *in vivo* beteiligt sind. CD152-Signale können die Effektorphase der T-Zellen beenden und über die Änderung des Chemokinrezeptorprofils die Migration der T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe und entzündete Gewebe ermöglichen. Migrieren die T-Zellen in Lymphknoten, können die CD152-Signale dort durch extrinsische Mechanismen dieIDO-Produktion der APZ induzieren und darüber die Proliferation der T-Zellen begrenzen. T-Zellen, die vermehrt an die Infektionsorte wandern, können die Immunantworten über die Zytokinproduktion und Anlockung weiterer Immunzellen verstärken. Mit der Einwanderung CD152-positiver T-Zellen gelangen gleichzeitig regulierende Mechanismen zur Beendigung der Immunantwort in die Gewebe. Dies scheint physiologisch vorteilhaft sein, denn auch andere inhibitorische Kostimulationsmoleküle können die T-Zellantwort über die Beeinflussung der Migration steuern. So wurde gezeigt, dass ICOS die Migration humaner T-Zellen induziert [260] und inhibitorische OX40-Moleküle der TNF-Familie die T-Zellmigration zu Keimzentren erhöht [261]. Die über inhibitorische Moleküle vermittelte Chemotaxis der T-Zellen könnte einen generellen Mechanismus darstellen, der zum Erhalt der Toleranz beiträgt und dem Schutz vor Autoimmunreaktionen dient.

4.6 Die Bedeutung von CD152-Signalen für die erhöhte Sensibilität von Chemokinrezeptoren

Nach der Bindung von Chemokinen an die Chemokinrezeptoren phosphorylieren GRK die Rezeptoren und leiten damit die Internalisierung der Chemokinrezeptoren ein. Für den Chemokinrezeptor CCR5, der auch in dieser Arbeit untersucht wurde, ist eine Schlüsselrolle von GRK1-7 bei der verstärkten Phosphorylierung nachgewiesen worden [262].

Die Analyse des Gesamtgehalts von GRK2 in CD152-defizienten und CD152-kompetenten CD4⁺ T-Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen den Populationen (s. Abb. 15 C). Aus Modellsystemen mit GRK2-heterozygoten Tieren ist jedoch bekannt, dass die Migration der

T-Lymphozyten in Reaktion auf den CCR5-Liganden CCL4 erhöht ist, weil die Tiere eine reduzierte Anzahl von GRK2-Proteinen aufweisen [197]. Die weite Verbreitung des Signalproteins GRK2 führte in den Westernblotanalysen der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich zu einem zu starken Hintergrund, um Unterschiede durch CD152-Engagement erkennen zu können (s. Abb. 15 C). Die Beteiligung von CD152-Signalen an der Regulierung von GRK2 spiegelte sich aber in der phosphorylierten, nicht aktiven Form von GRK2 wider. Die Phosphorylierung von GRK2 am Serinrest 670 führt zur Reduktion der Kinase-Aktivität und der Bindungsfähigkeit an G β -Untereinheiten [263]. Die phosphorylierte Form von GRK2 war nach spezifischer Induktion des Chemokinrezeptors durch CCL4-Gabe in CD152-positiven T_H1-Zellen verglichen mit CD152-defizienten Zellen selektiv erhöht (s. Abb. 15 C). In CD152-defizienten Tieren werden die Chemokinrezeptoren der T-Zellen nach der Ligandenbindung durch aktives GRK2 phosphoryliert. Entsprechend binden β -Arrestine und können die Desensibilisierung und Endozytose der Chemokinrezeptoren einleiten. Dagegen liegen in CD152-kompetenten T_H1-Zellen vermehrt inaktive GRK2-Proteine vor. Diese phosphorylieren die Chemokinrezeptoren nicht, und inhibierende β -Arrestine können nicht binden. Stattdessen können erneut G-Proteine an die Chemokinrezeptoren koppeln und diese wieder in ihren aktiven Zustand versetzen, so dass weitere Signale für die Migration gegeben werden können. Der erhöhte Anteil an inaktivem GRK2 und die daraus resultierende geringere Phosphorylierung des Rezeptors zeigen sich somit verantwortlich für die verbesserte gerichtete Migration der CD152-kompetenten T_H1-Zellen.

Die differentielle Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR5 auf CD4⁺ T-Zellen unter CD152-Engagement (s. Abb. 13 B-D), die mit der gesteigerten Migrationsfähigkeit CD152-kompetenter T_H1-Zellen korrelierte, machte deutlich, dass CD152-Signale die Migration über die Expression der Chemokinrezeptoren regulieren. Durch die CD152-vermittelte Inaktivierung von GRK2 wird der Mechanismus dieses Effektes aufgedeckt: CD152-Signale können die Verfügbarkeit der Chemokinrezeptoren regulieren. Sie steuern über den Phosphorylierungsstatus der Chemokinrezeptoren die Desensibilisierung der Chemokinrezeptoren, eine der schnellsten Regulierungsmöglichkeiten der Migration, und leiten damit Internalisierungsprozesse ein. Diese Regulation der Chemokinrezeptoren über den Phosphorylierungsstatus, der in dieser Arbeit für den Chemokinrezeptor CCR5 festgestellt wurde, könnte ein Mechanismus der CD152-Signale sein, erhöhte Sensibilität auch anderer Chemokinrezeptoren zu bewirken.

4.7 Die Wirkung des CD152-Engagements auf Chemokin-induzierte Signalwege

Bei der Vielzahl der Signalmoleküle, die an den unterschiedlichen Prozessen der Migration beteiligt sein können, konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf diejenigen, deren fundamentale Bedeutung bei der Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren in unterschiedlichen Systemen bestätigt wurde. In CD152-defizienten und CD152-kompetenten T_H1-Zellen wurde das durch MAPK-Kaskaden aktivierbare Molekül ERK nach der Induktion von Chemokinrezeptorsignalen durch CCL4 untersucht. Durchflusszytometrisch konnte keine Chemokin-vermittelte Phosphorylierung von ERK detektiert werden (s. Abb. 16), obwohl die Aktivierung von MAPK-Kaskaden über G-Protein-Signalmoleküle oder Adapterproteine für andere Chemokinrezeptoren gezeigt wurde [176,177]. Die relative Beteiligung von ERK und anderen Signalmolekülen kann zwischen einzelnen Chemokinrezeptoren variieren. Unterschiedliche experimentelle Ansätze, die Art der verwendeten Zelltypen sowie die Differenzierung zu T_H1-Zellen können die Migration und ihre Signalwege beeinflussen und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Eine weitere Ursache dafür könnte in den Zeitpunkten der Untersuchungen während der sekundären Stimulation liegen, da sich Antigen-erfahrene, ruhende T-Zellen in der Expression ihrer Chemokinrezeptoren von naiven oder kurz zuvor aktivierten T-Zellen unterscheiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eindeutig die Beteiligung von PI3'K an der Migration von T_H1-differenzierten Wildtypzellen. Die Signale des Chemokinrezeptors CCR5 wurden durch die Zugabe von CCL4 induziert und der Nachweis erfolgte über die Aktivierung des PI3'K-Zielmoleküls Akt (s. Abb. 17). Die funktionelle Bestätigung für die Abhängigkeit der Migration CD152-kompetenter T_H1-Zellen von PI3'K erfolgte durch Chemotaxisversuche unter dem Einsatz von PI3'K-Inhibitoren (s. Abb. 18). Diese Daten stimmen mit der Schlüsselfunktion der PI3'K für die Lymphozytenmigration überein, die u. a. Chemokingradientenwahrnehmung und Zytoskelettlagerungen ermöglicht [202,203,264]. Das Ausmaß der PI3'K-Beteiligung und die Wahl der PI3'K-Isoform an migratorischen Prozessen wird allerdings unterschiedlich erörtert [208,265]. Selbst PI3'K-unabhängige Migrationsantworten wurden in aktivierten oder T_H2-differenzierten humanen T-Zellen bei *in vitro* Migrationsversuchen nachgewiesen [221,266]. Der Aktivierungszustand von T-Zellen kann die Relevanz von PI3'K auf die Migration verändern. So war die Induktion der Migration durch CXCL12 *ex vivo* bei isolierten humanen T-Zellen abhängig von PI3'K, wurde aber nach zwei Tagen TZR-Stimulation PI3'K-unabhängig [267] über PKC θ reguliert [265]. In den Versuchen dieser Arbeit wurde dagegen festgestellt, dass die Migration von CD4⁺ T_H1-Zellen auch noch fünf Tage nach Beginn der sekundären Stimulation durch PI3'K gesteuert wird

(s. Abb. 17). Die Zugabe von CCL4 zur Auslösung von CCR5-Signalen induzierte weder in CD152-defizienten noch in CD152-kompetenten CD4⁺ T_H1-Zellen in Westernblotanalysen detektierbare Aktivierung von PKC θ (ohne Abb.). Dieser Unterschied könnte u. a. an dem Chemokinrezeptor selbst liegen. Denn es ist fraglich, ob sich die inflammatorischen Chemokinrezeptoren der gleichen Signalwege bedienen wie die konstitutiv exprimierten, homöostatischen Rezeptoren CCR7 und CXCR4. An Entzündungen sind vielfältige Faktoren, die die Migration mitbestimmen können, beteiligt. So sind im inflammatorischen Milieu andere Chemokine auf meist höherem Niveau präsent, die an mehrere Rezeptoren binden können, und es werden unterschiedliche Adhäsionsliganden induziert.

Interessanterweise wurde das Signalmolekül Akt durch CD152-Engagement differentiell beeinflusst. CD152-defiziente T_H1-Zellen zeigten im Gegensatz zu CD152-positiven Zellen keine Chemokin-induzierte Akt-Aktivierung. Die Akt-Aktivierung und die Migration der CD152-kompetenten T_H1-Zellen zeigten sich hingegen abhängig von PI3'K, da bei der Inhibierung aller PI3'K-Isoformen durch die Zugabe des PI3'K-Breitspektrum-inhibitors Ly294.002 die Akt-Phosphorylierung zu den untersuchten Zeitpunkten verhindert wurde (s. Abb. 17). Die Bedeutung von Akt für die Migration liegt in der Steuerung der für chemotaktische Prozesse notwendigen Polarisierung mit anterior–posterior Achse [198,268] und in der Reorganisation des Zytoskelettes u. a. durch die Aktivierung des Zielmoleküls Aktin [218]. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass inflammatorische T_H1-Zellen das Engagement von CD152 für die Aktivierung von Akt und damit für die zielgerichtete Migration zu lymphatischen und peripheren Geweben benötigen. Während für den Einfluss von Akt-Signalen auf die Überlebensrate von Zellen ein niedriges Aktivierungsniveau von Akt ausreicht, ist für die Regulierung der Migration die maximale Akt-Aktivierung nötig [224]. Die Richtungsorientierung bei der Migration der CD152-kompetenten T-Zellen könnte also darauf beruhen, dass CD152-Signale aus den komplexen Signaltransduktionswegen der Chemokinrezeptoren die Akt-regulierte Polarisierung der Zellen verstärken. In Abwesenheit von CD152-Signalen würde die Lokalisierung der T_H1-Zellen durch ungerichtete, Integrin-vermittelte Adhäsion dominiert werden.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der CD152-Signale auf die PI3'K-gesteuerte Chemotaxis bereits aktivierter T_{EFF}-Zellen nachgewiesen. Zusammen mit den bekannten Daten, dass CD152-Signale über PI3'K-abhängige Prozesse für die Resistenz von T-Zellen gegen AICD verantwortlich sind [48,49], ergibt sich, dass aus der Gesamtmenge der T-Lymphozyten die T-Zellen, die CD152-Signale erhalten haben, verstärkt in Lymphknoten oder entzündetes Gewebe einwandern und dort überleben können. Damit könnten CD152-Signale die Auswahl der am besten geeigneten T-Zellen für eine Immunreaktion steuern. Abhängig vom Verlauf der Stimulation und der gebildeten Chemokingradienten könnte das

CD152-Engagement aktiv in das Schicksal der T_{EFF}-Zellen eingreifen, indem es die entscheidenden Signale gibt, Pathogene zu bekämpfen und die Differenzierung von T-Zellen in Gedächtniszellen voranzutreiben. In Anlehnung an das Schema von Thelen [179] lassen sich die Daten der Literatur und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (grau unterlegt), in einem Modell zusammenfassen (Abb. 22).

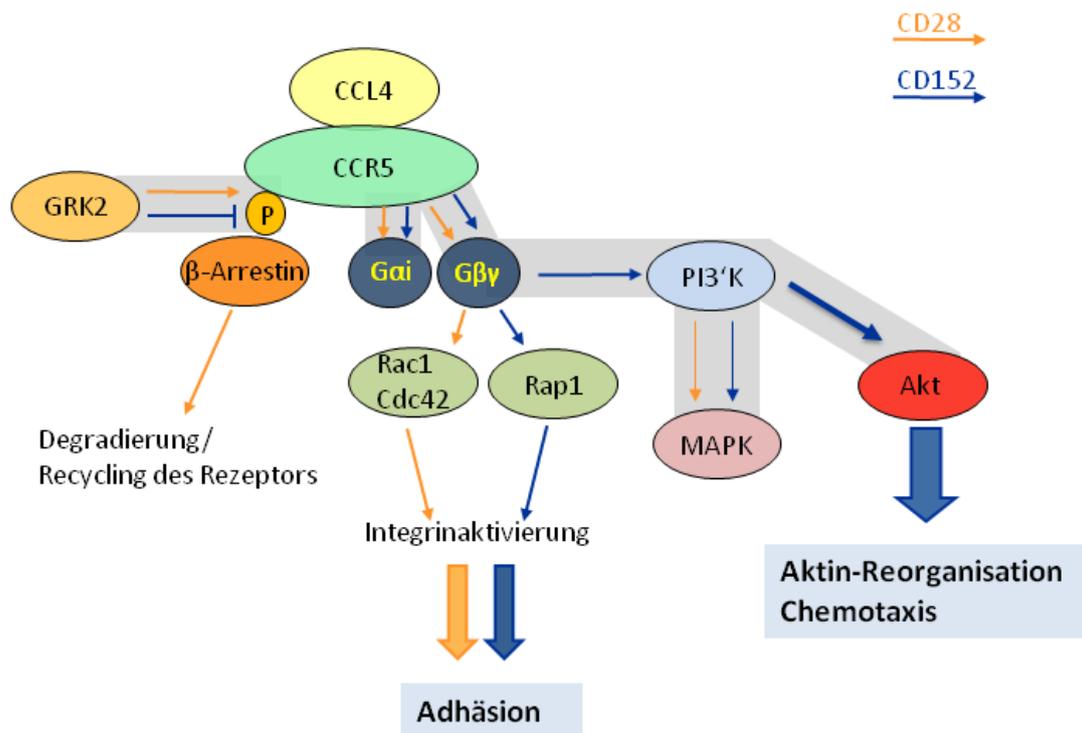


Abb. 22 Einfluss von CD28- und CD152-Signalen auf die Signaltransduktion des Chemokinrezeptors CCR5 in CD4⁺ TH1-Zellen. Nach Bindung des Liganden CCL4 wird der Rezeptor in Anwesenheit von CD28-Signalen durch GRK2 phosphoryliert. β-Arrestine können den phosphorylierten Rezeptor binden und leiten die Desensibilisierung ein, die zum Abbau oder zum Recycling des Rezeptors führen. Bei CD152-Engagement wird GRK2 inaktiviert und die Phosphorylierung des Chemokinrezeptors verhindert, so dass dieser auf der Oberfläche bleibt. CD28- und CD152-Signale induzieren durch die Gβγ-Untereinheit und über die GTPasen Rac1 und Cdc42 bzw. Rap1 die Aktivierung von Integrinen, die zur Adhäsion der Zellen führt. Nur in Anwesenheit von CD152-Signalen löst die Chemokin-induzierte PI3'K-Aktivierung die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt aus, die zielgerichtete Migration über Chemokingradienten bewirkt. (Orange Pfeile markieren Signalwege unter dem Einfluss von CD28-Signalen, blaue Pfeile die Wege unter CD152-Einfluss; durchgestrichene Pfeile bedeuten, dass keine Aktivierung stattfindet). Das Schema berücksichtigt Daten der Literatur und die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit (grau unterlegt). Es bildet nicht die Signalwege in ihrer gesamten Komplexität ab, sondern fokussiert auf die durch CD152-Signale differenziell regulierten Signalwege.

In Anwesenheit von CD28-Signalen kommt es bei der Aktivierung des Chemokinrezeptors CCR5 durch den Liganden CCL4 auf T_H1-Zellen zur Phosphorylierung des Rezeptors durch GRK2-Proteine (s. Abb. 15), was die Desensibilisierung des Chemokinrezeptors bewirkt. CD152-Engagement führt durch Phosphorylierung von GRK2 zur Inaktivierung der katalytischen Aktivität und verhindert dadurch die Desensibilisierung des Chemokinrezeptors (s. Abb. 15 C), [263]. Für die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren haben sich $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine gegenüber den α -Untereinheiten als die bedeutenderen Signalmoleküle herausgestellt [171]. Sowohl in Anwesenheit von CD28- als auch von CD152-Engagement aktivieren $\beta\gamma$ -Untereinheiten unterschiedliche GTPasen, die ihrerseits die Integrin-vermittelte Adhäsion der T-Zellen induzieren. CD28-Signale führen über Zytoskelettlagerungen durch die GTPasen Rac1 [226] und Cdc42 [227] zu erhöhter Integrin-vermittelter Adhäsion [225]. CD152-Signale steigern die LFA-1-Integrin-vermittelte Adhäsion über Rap1-gesteuerte Signalwege [58]. Die LFA-1-vermittelte Adhäsion mit erhöhter Ligandenaktivität kann zur Immobilisation der Zellen führen, wird aber auch für eine gesteigerte Mobilität benötigt. Grundsätzlich wird allerdings der Einfluss von Integrinen für die Leukozytenmigration *in vivo* als verzichtbar diskutiert [269,270], wodurch anderen Signalwegen der Chemokinrezeptoren bei der Lokalisierung von T-Zellen eine prominentere Bedeutung zukommt. Für die PI3'K-abhängige Akt-Aktivierung differenzierter T_H1-Zellen ist die Anwesenheit von CD152-Signalen nötig, um zielgerichtete Chemotaxis der T-Zellen auszulösen (s. Abb. 17). Der Einfluss von CD152-Signalen könnte auf der Ausbildung einer anterior-posterior-Achse beruhen und damit die Mobilität von T-Zellen steigern, wie es für humane und murine T-Zellen veranschaulicht wurde [59]. Das Engagement von CD152 bewirkt die Polarisierung der Zellen, womit die Voraussetzung für das Verlassen der Blutgefäße und effiziente Migration ins Gewebe erfüllt ist [59].

4.8 Relevanz der CD152-vermittelten Migration von T_H1-Zellen *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse der *in vitro* Migration zu homöostatischen und inflammatorischen Chemokinen durch Transfermodelle *in vivo* bestätigt werden (s. Abb. 19 und Abb. 20). CD152-kompetente CD4⁺ T-Zellen wurden im Vergleich mit CD152-defizienten CD4⁺ T-Zellen vermehrt in Lymphknoten der Empfängertiere bei *in vivo* Transferexperimenten detektiert (s. Abb. 19). Für den Eintritt von ruhenden T-Zellen aus dem Blut in Lymphknoten ist der homöostatische Rezeptor CCR7 entscheidend [253,271], dessen Expression übereinstimmend auf CD152-positiven T_H1-Zellen im Vergleich mit CD152-defizienten Zellen erhöht war (s. Abb. 13 B). Analoge Effekte *in vitro* und *in vivo* sind nicht selbstverständlich, denn die Migration von T-Zellen, die in

Transwell-Systemen gemessen wird, kann im Organismus durch zahlreiche Faktoren u. a. die Antigenpräsentation durch APZ, den Einfluss unterschiedlicher Chemokine und den Blutstrom verändert werden. Beispielsweise konnten Daten aus *in vitro* Studien, in denen die Migration Vav-defizienter T-Zellen vermindert war und sich abhängig von dem GEF-Signalmolekül Vav zeigte, bei *in vivo* Experimenten nicht auf Vav-Moleküle zurückgeführt werden [244].

In einem DTH-Entzündungsmodell wurde die bessere Migrationsqualität von CD152-kompetenten T_H1 -Zellen zu entzündungsassoziierten Chemokinen auch *in vivo* demonstriert. CD152-kompetente T_H1 -Zellen wanderten im Vergleich mit CD152-defizienten T_H1 -Zellen in dem DTH-Transfermodell verstärkt in entzündetes Gewebe der Empfängertiere ein (s. Abb. 21 B). Das Verlassen der Blutgefäße und die Einwanderung von Lymphozyten ins Gewebe werden von Chemokinen ausgelöst, die an der Entzündungsstelle präsent sind. Zu den entzündungsassoziierten Chemokinen zählen auch die Chemokine CXCL12 und CCL4 [272,273], für die in dieser Arbeit eine erhöhte *in vitro* Migration von CD152-kompetenten T_H1 -Zellen nachgewiesen wurde (s. z. B. Abb. 6). Es ist anzunehmen, dass auch diese inflammatorischen T_H1 -Chemokine an der CD152-vermittelten Antigen-spezifischen Ansammlung der T_H1 -Zellen im Gewebe beteiligt sind.

Die Expression homöostatischer Chemokine, die an CCR7 binden, kann ebenfalls in Entzündungssituationen verändert sein und die Migration von T-Zellen in nicht-lymphatische Gewebe beeinflussen [274]. Bei chronischen Entzündungen ist die Expression von CCL19 in arteriosklerotischen Läsionen erhöht [275], und im Pankreas des Diabetesmausmodells NOD wird CCL21 exprimiert [276]. Im MS-Mausmodell (EAE) korreliert die vermehrte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 im zentralen Nervensystem mit dem Schweregrad der Erkrankung [277]. Analog dazu ist auch bei den Transferexperimenten dieser Arbeit eine Beteiligung des Rezeptors CCR7 denkbar. Der Rezeptor CCR7, der durch CD152-Engagement auf T_H1 -Zellen differentiell exprimiert wird, könnte die Migration von T_{EFF} -Zellen sowohl in lymphatische wie auch in entzündete Gewebe verstärken, da auch inflammatorische T_H1 -differenzierte Zellen bei *in vitro* Versuchen zu dem CCR7-Liganden CCL19 migrierten (z.B. Abb. 8).

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass T-Zellen nicht zielgerichtet und effizient in Lymphknoten und entzündetes Gewebe migrieren können, solange keine Signale über CD152-Rezeptoren von der Oberfläche der T-Zellen erfolgen. Auch die Verteilung transferierter CD152-defizienter T-Zellen *in vivo* könnte ein Hinweis auf eher ungerichtete Adhäsionsmechanismen sein (s. Abb. 19). 24 Stunden nach dem Transfer von CD152-defizienten Zellen wird eine erhöhte Anzahl T_H1 -Zellen in der Lunge der

Empfängertiere detektiert. Die Lunge ist das erste Organ, das die Zellen nach einer i.v.-Injektion mit dem Blutstrom passieren. Deswegen findet sich dort eine erhöhte Anzahl transferierter Zellen wenige Stunden nach einem Zelltransfer wieder. Die Zellen wandern anschließend weiter und nach 24 Stunden erreicht die Verteilung transferierter Zellen einen stabilen Zustand im Fließgleichgewicht [278]. Die erhöhte Anzahl CD152-defizienter T_H1 -Zellen in Abb. 19 zu diesem Zeitpunkt weist daraufhin, dass die Zellen dort möglicherweise über ungerichtete Adhäsionsmechanismen zurückgehalten werden. Die Fähigkeit der Zellen zu zielgerichteter Migration ist jedoch eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der adaptiven Immunantwort in der Peripherie. Über die Regulierung der gerichteten Migration könnten CD152-Signale daran mitwirken, dass T-Lymphozyten dorthin gelangen, wo sie benötigt werden. Die korrekte Positionierung in lymphatischen Geweben zur Erkennung von Antigenen ist ebenso wichtig wie die Einwanderung in periphere Gewebe zur Bekämpfung von Infektionen. Die modulierende Funktion von CD152-Signalen bei der Lokalisierung von T_H -Zellen trägt so dazu bei, Immunantworten fortzusetzen. Außerdem könnten die CD152-Signale nicht nur die Migration von T_H1 -Effektorzellen regulieren, sondern auch die Einwanderung von T_{reg} -Zellen in entzündetes Gewebe beeinflussen. T_{reg} -Zellen exprimieren CCR5-, CCR7- so wie CD152-Rezeptoren und können durch die Suppression von T_{EFF} -Zellen die Schädigung körpereigenen Gewebes mit fatalen Folgen verhindern. Die Steuerung der Migration durch CD152-Signale könnte dazu beitragen, die periphere Balance zwischen T_{reg} -Zellen und autoreaktiven T-Zellen aufrechtzuerhalten.

4.9 Ausblick auf die therapeutische Nutzbarkeit

Angesichts dieser erstmals beschriebenen Wirkung des CD152-Engagements auf die Chemokin-vermittelte Migration von $CD4^+$ T-Zellen, zeigte sich, dass CD152-Rezeptoren eine Alternative zu Chemokinen und Chemokinrezeptoren als Zielmoleküle therapeutischer Ansätze bei der Steuerung der T-Zellokalisierung darstellen könnten. Chemokinrezeptoren zählen zwar wegen ihrer weiten Verbreitung auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu vielversprechenden Zielen bei der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen. Bislang waren sie aber bei der Steuerung der T-Zellokalisierung wegen ihrer hohen Redundanz, d.h. ihrer Fähigkeit meist mehrere Liganden zu binden, nur eingeschränkt als Zielmoleküle nutzbar. Versuche mit spezifischen Antagonisten, die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CCR9, CXCR3 und CXCR4 pharmazeutisch zu regulieren, haben außer bei dem CCR5-Inhibitor Maraviroc, der bei AIDS-Therapien eingesetzt wird, bisher keine klinischen Erfolge gebracht [279]. Die Präsenz verschiedener Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche einzelner Zellen limitiert ebenfalls den Einsatz von

spezifischen Antagonisten eines Chemokinrezeptors. Daher wird die Option diskutiert, mehrere Chemokinrezeptoren mit einem Antagonisten zu modulieren. Eine Möglichkeit könnte in der Steuerung der Signalwege von Chemokinrezeptoren liegen, mit denen mehrere chemoattraktive Rezeptoren gleichzeitig reguliert und somit das Problem der Redundanz umgangen werden könnte. PI3'K-Moleküle stellen eine Gruppe aussichtsreicher Ziele für Inhibitoren dar [201,280,281].

Nach der in dieser Arbeit festgestellten Bedeutung der CD152-Ligation auf die Chemokinrezeptor-PI3'K-vermittelte Signalwege, bietet es sich auch an, CD152-Moleküle pharmakologisch zu nutzen, um die Migration der T-Zellen zu verändern. Die Manipulation von CD152-Signalen durch blockierende Antikörper wird bereits bei der Krebstherapie angewendet [75], und das Fusionsprotein CTLA-4-Ig wird zur Verhinderung von CD80/CD86-Bindung an CD152-Rezeptoren bei der Behandlung von RA eingesetzt [78]. Möglicherweise ist die Effektivität der CTLA-4-Ig-Behandlungen auch auf ein verändertes Migrationsverhalten der T-Zellen zurückzuführen. Die Steuerung der T-Zell-Lokalisierung über kostimulatorische Moleküle könnte ein Teil des Mechanismus sein, auf dem die therapeutische Wirkung beruht. Die Veränderung von CD152-Signalen auf T-Zellen könnte auch zur Therapie weiterer Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, die mit veränderter Expression von Chemokinrezeptoren assoziiert sind. So zeigen infiltrierende T-Zellen z. B. bei RA die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 [282], bei MS CXCR3 und CCR5 [162], bei einer Psoriasis CCR4, CCR6, CXCR2 und CXCR3 [283] und bei einer Neurodermitis die Rezeptoren CCR4, CCR8 und CCR10 [283]. Insbesondere bei solchen Krankheiten, die durch die erhöhte Expression mehrerer Chemokinrezeptoren gekennzeichnet sind, wäre eine Therapie über das Zielmolekül CD152 vorteilhaft, so dass verschiedene Chemokinrezeptoren über einen Mechanismus reguliert werden könnten.

5 Zusammenfassung

Die Positionierung Antigen-erfahrener T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen und am Ort der Entzündung ist eine grundlegende Voraussetzung für die Ausführung adaptiver Immunantworten. Sie wird von Interaktionen zwischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren der T-Zellen eingeleitet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des kostimulatorischen Moleküls CD152 auf die Migrationsfähigkeit inflammatorischer T_H1 -Zellen untersucht. Primäre $CD4^+$ T-Zellen wurden zu T_H1 -Zellen differenziert und die Migration wurde *in vitro* in Transwellssystemen untersucht. Die genetische CD152-Defizienz ($CD152^{-/-}$) reduzierte sowohl bei polyklonaler Aktivierung der T-Zellrezeptoren (TZR) als auch bei Antigen-spezifischer Stimulation TZR-transgener CD152-defizienter $CD4^+$ T_H1 -Zellen die chemotaktischen Fähigkeiten von T_H1 -Zellen zu den homöostatischen Chemokinen CCL19 und CXCL12 und zu dem entzündungsassoziierten Chemokin CCL4. Die serologische Inaktivierung von CD152-Signalen durch spezifische Fab-Fragmente bestätigte diese Ergebnisse und zeigte, dass die Oberflächenexpression von CD152 notwendig ist. Definierte CD152-Signale durch die Stimulation voraktivierter T_H1 -Zellen mit Antikörper-beschichteten Mikropartikeln und die Rekonstitution von CD152-Molekülen in CD152-defizienten Zellen durch retrovirale Transduktion von CD152-cDNA konnten auch in aktivierten $CD4^+$ T-Zellen die gerichtete Chemokin-induzierte Migration verstärken. Die Erhöhung der CD152-Expression durch die starke Aktivierung TZR-transgener $CD4^+$ T_H1 -Zellen mit hoher Antigenosis sowie durch die Präsentation des Antigens von Dendritischen Zellen korrelierte mit gesteigerten chemotaktischen Eigenschaften von T_H1 -Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Chemokinrezeptoren nicht grundsätzlich mit der funktionellen Migration übereinstimmt. Die Oberflächenexpression von CCR7 und CCR5, nicht jedoch die von CXCR4, wird durch CD152-Signale erhöht. Analysen der Signaltransduktion des Chemokinrezeptors CCR5 ergaben eine Regulierung wichtiger Signalwege unter CD152-Ligation. Wie erwartet erfolgte die Migration der T_H1 -Zellen über G α -Protein-abhängige Prozesse. G-Protein-gekoppelte Kinase-2, die die Desensibilisierung der Chemokinrezeptoren einleitet, war in CD152-kompetenten T_H1 -Zellen verstärkt inaktiviert. Ausschließlich in Anwesenheit von CD152-Signalen erfolgte die PI3'K-abhängige Akt-Aktivierung nach CCL4-induzierten Chemokinrezeptorsignalen.

Die Migration radioaktiv markierter T_H1 -Zellen nach adoptivem Transfer bestätigte die Bedeutung von CD152-Signalen für die Lokalisierung der Zellen *in vivo*. CD152-kompetente T_H1 -Zellen

migrierten vermehrt in Lymphknoten, im Entzündungsmodell der DTH (*delayed type hypersensitivity*) auch in entzündetes Gewebe.

Die Ergebnisse zeigen, dass CD152-Signale nicht nur inhibitorische Wirkung auf T-Zellfunktionen ausüben. Die neu entdeckte Funktion des CD152-Moleküls, Signale für die korrekte Positionierung von T-Zellen in einer Entzündung zu geben, ergänzt die Bedeutung von CD152-Signalen bei der Kontrolle peripherer Immunantworten. CD152-Signale könnten zum Ziel therapeutischer Ansätze werden, um zelluläre Zusammensetzungen an Entzündungsherden zu verändern.

Summary

Positioning of antigen-primed T cells in secondary lymphoid tissues and at sites of antigenic challenge is a mandatory requirement for functional adaptive immune responses. Localisation of cells is induced by chemokine-chemokine receptor interactions.

Here, the impact of the costimulatory molecule CD152 on the migratory capacity of inflammatory Th1 cells was analysed. Primary CD4⁺ T cells were differentiated into T_H1 cells and migration was measured *in vitro* by chemotaxis assays in transwell systems. Genetic deficiency of CD152 (CD152^{-/-}) reduced chemotaxis of T_H1 cells towards the homeostatic chemokines CCL19 and CXCL12 and the pro-inflammatory chemokine CCL4. CD4⁺ T_H1 cells showed the same results after polyclonally T cell receptor (TCR) stimulation as antigen-specific activation of TCR-transgenic CD152^{-/-} CD4⁺ T_H1 cells. Serological inactivation of CD152 by specific Fab-fragments confirmed increased migration of T_H1 cells in the presence of CD152. Defined CD152-signals given by antibody-coupled microspheres and the reconstitution of CD152 in CD152-deficient cells by retroviral transduction of CD152-cDNA demonstrated, that CD152-signals can enhance chemokine-induced migration even in activated T_H1 cells. Elevation of CD152-expression on CD4⁺ T_H1 cells induced by strong TCR-activation through high levels of antigen or by antigen presentation through dendritic cells correlated with augmented chemotactic response of T_H1 cells.

The study illustrated that the expression of chemokine receptors does not generally display the functional migration. CD152-signals induced the surface expression of CCR7 and CCR5 but not of CXCR4. Analysis of signal transduction pathways of CCR5 in T_H1 cells with or without CD152-signals revealed G α i-protein dependent processes. CD152-engagement led to CCL4-induced inactivation of G-protein-coupled-kinase-2 and PI3'K-dependent Akt-activation.

Adoptive transfers of radioactively labeled T_H1-cells were used for *in vivo* studies of migration behaviour. Transferred T_H1 cells supported the relevance of CD152-signals for the localisation of T cells, because increased levels of CD152-positive cells were found in lymph nodes and in inflamed tissue after induction of an infection in the delayed type hypersensitivity model (DTH).

These data represent the plasticity of CD152-signals. CD152 does not only perform inhibitory responsibilities, moreover it directs T cells for proper localisation in draining lymph nodes and inflamed tissues. This novel function adds to the known importance of CD152-engagement in the control of peripheral immune responses. Therefore CD152 could be of therapeutic interest by regulating cellular compositions at sites of antigenic challenge.

6 Literatur

1. Murphy, KM, Travers, P, and Walport, M (2009) *Janeway Immunologie*, 7. Aufl.: Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg.
2. Kruisbeek AM, Amsen D (1996) Mechanisms underlying T-cell tolerance. *Curr Opin Immunol* 8: 233-244.
3. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL (1995) Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376: 177-180.
4. Meffre E, Catalan N, Seltz F, Fischer A, Nussenzweig MC, Durandy A (2001) Somatic Hypermutation Shapes the Antibody Repertoire of Memory B Cells in Humans. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 375-378.
5. Kyewski B, Klein L (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24: 571-606.
6. Kamradt T, Mitchison NA (2001) Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 344: 655-664.
7. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192: 303-310.
8. Strominger JL (1989) Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244: 943-950.
9. Celli S, Lemaitre F, Bousso P (2007) Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity* 27: 625-634.
10. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8: 89-95.
11. Rogers PR, Dubey C, Swain SL (2000) Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 164: 2338-2346.
12. Bretscher P, Cohn M (1970) A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169: 1042-1049.
13. Lafferty KJ, Cunningham AJ (1975) A new analysis of allogeneic interactions. *J Exp Biol Med Sci* 53: 27-42.
14. Linsley PS, Ledbetter JA (1993) The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11: 191-212.
15. Fisher WG, Yang PC, Medikonduri RK, Jafri MS (2006) NFAT and NFkappaB activation in T lymphocytes: a model of differential activation of gene expression. *Ann Biomed Eng* 34: 1712-1728.
16. Nurieva RI, Liu X, Dong C (2009) Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* 229: 88-100.
17. Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, Grosmaire LS, Rabinovitch PS, Lindsten T, Thompson CB, June CH (1990) CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood* 75: 1531-1539.
18. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174: 561-569.

19. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, Davis SJ (2002) The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17: 201-210.
20. Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, Erbe DV, Ikemizu S, Davis SJ, Stahl ML, Seehra J, Somers WS, Mosyak L (2001) Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 410: 608-611.
21. Schwartz JC, Zhang X, Nathenson SG, Almo SC (2002) Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol* 3: 427-434.
22. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, Lombard DB, Freeman GJ, Nadler LM, Gray GS, . (1993) Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 151: 3489-3499.
23. Alegre ML, Noel PJ, Eisfelder BJ, Chuang E, Clark MR, Reiner SL, Thompson CB (1996) Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol* 157: 4762-4770.
24. Maszyzna F, Hoff H, Kunkel D, Radbruch A, Brunner-Weinzierl MC (2003) Diversity of clonal T cell proliferation is mediated by differential expression of CD152 (CTLA-4) on the cell surface of activated individual T lymphocytes. *J Immunol* 171: 3459-3466.
25. Martin M, Schneider H, Azouz A, Rudd CE (2001) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J Exp Med* 194: 1675-1681.
26. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19: 565-594.
27. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP (2004) B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21: 401-413.
28. Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, Nakaseko C, Isono K, Bonifacino JS, Saito T (1997) Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 6: 583-589.
29. Perkins D, Wang Z, Donovan C, He H, Mark D, Guan G, Wang Y, Walunas T, Bluestone J, Listman J, Finn PW (1996) Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol* 156: 4154-4159.
30. Egen JG, Allison JP (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16: 23-35.
31. Baroja ML, Luxenberg D, Chau T, Ling V, Strathdee CA, Carreno BM, Madrenas J (2000) The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 164: 49-55.
32. Egen JG, Kuhns MS, Allison JP (2002) CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 3: 611-618.
33. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP (1999) CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* 162: 5813-5820.
34. Krummel MF, Allison JP (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183: 2533-2540.
35. Hoff H, Kolar P, Ambach A, Radbruch A, Brunner-Weinzierl MC (2010) CTLA-4 (CD152) inhibits T cell function by activating the ubiquitin ligase Itch. *Mol Immunol* 47: 1875-1881.

36. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J (2006) A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 24: 65-97.
37. Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, Reiner SL, Thompson CB (2000) Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* 164: 5319-5327.
38. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, Mak TW (1996) Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 272: 1170-1173.
39. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA (1998) Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282: 2263-2266.
40. Chuang E, Fisher TS, Morgan RW, Robbins MD, Duerr JM, Vander Heiden MG, Gardner JP, Hambor JE, Neveu MJ, Thompson CB (2000) The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13: 313-322.
41. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL (2005) CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25: 9543-9553.
42. Olsson C, Riesbeck K, Dohlsten M, Michaelsson E (1999) CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cell blasts. *J Biol Chem* 274: 14400-14405.
43. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3: 1097-1101.
44. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL (2004) Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 172: 4100-4110.
45. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Damle NK (1992) Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 176: 1595-1604.
46. Wu Y, Guo Y, Huang A, Zheng P, Liu Y (1997) CTLA-4-B7 interaction is sufficient to costimulate T cell clonal expansion. *J Exp Med* 185: 1327-1335.
47. Kwon H, Jun HS, Khil LY, Yoon JW (2004) Role of CTLA-4 in the activation of single- and double-positive thymocytes. *J Immunol* 173: 6645-6653.
48. Pandiyan P, Gartner D, Soezeri O, Radbruch A, Schulze-Osthoff K, Brunner-Weinzierl MC (2004) CD152 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3 kinase function. *J Exp Med* 199: 831-842.
49. Hoff H, Knieke K, Cabail Z, Hirseland H, Vratsanos G, Burmester GR, Jorch G, Nadler SG, Broker B, Hebel K, Brunner-Weinzierl MC (2009) Surface CD152 (CTLA-4) expression and signaling dictates longevity of CD28null T cells. *J Immunol* 182: 5342-5351.
50. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868.
51. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241.
52. Schneider H, Prasad KV, Shoelson SE, Rudd CE (1995) CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J Exp Med* 181: 351-355.

53. Schneider H, Valk E, Leung R, Rudd CE (2008) CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *PLoS ONE* 3: e3842.
54. Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, Nishina H, Lipkowitz S, Penninger JM (2000) Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 403: 211-216.
55. Carey KD, Dillon TJ, Schmitt JM, Baird AM, Holdorf AD, Straus DB, Shaw AS, Stork PJ (2000) CD28 and the tyrosine kinase Ick stimulate mitogen-activated protein kinase activity in T cells via inhibition of the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol* 20: 8409-8419.
56. Dillon TJ, Carey KD, Wetzel SA, Parker DC, Stork PJ (2005) Regulation of the small GTPase Rap1 and extracellular signal-regulated kinases by the costimulatory molecule CTLA-4. *Mol Cell Biol* 25: 4117-4128.
57. Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, Kinashi T (2003) Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* 161: 417-427.
58. Schneider H, Valk E, Dias SD, Wei B, Rudd CE (2005) CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12861-12866.
59. Wei B, da Rocha Dias S, Wang H, Rudd CE (2007) CTL-Associated Antigen-4 Ligation Induces Rapid T Cell Polarization That Depends on Phosphatidylinositol 3-Kinase, Vav-1, Cdc42, and Myosin Light Chain Kinase. *J Immunol* 179: 400-408.
60. Schneider H, Smith X, Liu H, Bismuth G, Rudd CE (2008) CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur J Immunol* 38: 40-47.
61. Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, Hogg N, Garside P, Rudd CE (2006) Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 313: 1972-1975.
62. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW (1995) Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl4. *Science* 270: 985-988.
63. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3: 541-547.
64. Vaidya B, Pearce SH, Charlton S, Marshall N, Rowan AD, Griffiths ID, Kendall-Taylor P, Cawston TE, Young-Min S (2002) An association between the CTLA4 exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies. *Rheumatology (Oxford)* 41: 180-183.
65. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der AB, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 5: 1075-1080.
66. Maurer M, Ponath A, Kruse N, Rieckmann P (2002) CTLA4 exon 1 dimorphism is associated with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 131: 213-215.

67. Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, Martins B, Andreia R, Viana JF, Crespo F, Vasconcelos C, Ferreira C, Vicente AM (2004) Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 12: 620-626.
68. [Anonymous] (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-678.
69. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di GG, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423: 506-511.
70. Liu MF, Wang CR, Chen PC, Fung LL (2003) Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 57: 568-572.
71. Oaks MK, Hallett KM (2000) Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol* 164: 5015-5018.
72. Wang XB, Kakoulidou M, Giscombe R, Qiu Q, Huang D, Pirskanen R, Lefvert AK (2002) Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J Neuroimmunol* 130: 224-232.
73. McCoy K, Camberis M, LeGros G (1997) Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *Journal of Experimental Medicine* 186: 183-187.
74. Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271: 1734-1736.
75. Hodi FS (2007) Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. *Clin Cancer Res* 13: 5238-5242.
76. Webb LM, Walmsley MJ, Feldmann M (1996) Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol* 26: 2320-2328.
77. Finck BK, Linsley PS, Wofsy D (1994) Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* 265: 1225-1227.
78. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF, Williams GR, Becker JC, Hagerty DT, Moreland LW (2003) Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *New England Journal of Medicine* 349: 1907-1915.
79. Alegre ML, Fallarino F (2006) Mechanisms of CTLA-4-Ig in tolerance induction. *Curr Pharm Des* 12: 149-160.
80. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Caton AJ (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2: 301-306.
81. Blander JM, Sant'Angelo DB, Bottomly K, Janeway CA, Jr. (2000) Alteration at a single amino acid residue in the T cell receptor alpha chain complementarity determining region 2 changes the differentiation of naive CD4 T cells in response to antigen from T helper cell type 1 (Th1) to Th2. *J Exp Med* 191: 2065-2074.

82. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K (1995) Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 182: 1591-1596.
83. Oosterwegel MA, Mandelbrot DA, Boyd SD, Lorscheid RB, Jarrett DY, Abbas AK, Sharpe AH (1999) The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. *J Immunol* 163: 2634-2639.
84. Bour-Jordan H, Grogan JL, Tang Q, Auger JA, Locksley RM, Bluestone JA (2003) CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nat Immunol* 4: 182-188.
85. Kato T, Nariuchi H (2000) Polarization of naive CD4⁺ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation. *J Immunol* 164: 3554-3562.
86. Boyton RJ, Altmann DM (2002) Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol* 23: 526-529.
87. Scharon TM, Scott P (1993) Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 178: 567-577.
88. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
89. Hunter CA, Reiner SL (2000) Cytokines and T cells in host defense. *Curr Opin Immunol* 12: 413-418.
90. Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2: 845-858.
91. Crane IJ, Forrester JV (2005) Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 25: 75-102.
92. Mowen KA, Glimcher LH (2004) Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev* 202: 203-222.
93. Snapper CM, Paul WE (1987) Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236: 944-947.
94. Simon AK, Seipelt E, Sieper J (1994) Divergent T-Cell Cytokine Patterns in Inflammatory Arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8562-8566.
95. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.
96. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-189.
97. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8: 967-974.
98. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126: 1121-1133.
99. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG (2007) Cutting edge: An in vivo

- requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179: 4313-4317.
100. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28: 454-467.
 101. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P (2004) Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190: 624-631.
 102. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13: 1173-1175.
 103. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I (2000) Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43: 2455-2463.
 104. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W (2000) High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 164: 2832-2838.
 105. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70.
 106. Maloy KJ, Powrie F (2001) Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2: 816-822.
 107. Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-352.
 108. Fontenot JD, Rudensky AY (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6: 331-337.
 109. von BH (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6: 338-344.
 110. de la RM, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A (2004) Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34: 2480-2488.
 111. Shevach EM (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195-201.
 112. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-742.
 113. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265: 1237-1240.
 114. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342.
 115. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30: 626-635.
 116. Apostolou I, von BH (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199: 1401-1408.
 117. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von BH (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6: 1219-1227.

118. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von BH (2002) Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3: 756-763.
119. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322: 271-275.
120. Zhou L, Chong MM, Littman DR (2009) Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30: 646-655.
121. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29: 138-149.
122. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM (2009) Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 10: 385-393.
123. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S (2009) Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323: 1488-1492.
124. Veldhoen M, Uyttenhove C, van SJ, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B (2008) Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9: 1341-1346.
125. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F (2009) Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10: 857-863.
126. Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B (2009) The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9: 811-816.
127. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.
128. Kunkel EJ, Butcher EC (2003) Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3: 822-829.
129. Rollins BJ (2001) Chemokines and atherosclerosis: what Adam Smith has to say about vascular disease. *J Clin Invest* 108: 1269-1271.
130. Ley K (2003) The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 9: 263-268.
131. Russell S (2008) How polarity shapes the destiny of T cells. *J Cell Sci* 121: 131-136.
132. Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4: 110-122.
133. Kunkel EJ, Butcher EC (2002) Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16: 1-4.
134. Springer TA (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57: 827-872.
135. Manes TD, Pober JS (2008) Antigen presentation by human microvascular endothelial cells triggers ICAM-1-dependent transendothelial protrusion by, and fractalkine-dependent transendothelial migration of, effector memory CD4+ T cells. *J Immunol* 180: 8386-8392.
136. Friedl P, Weigelin B (2008) Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 9: 960-969.
137. Gerard C, Rollins BJ (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2: 108-115.

138. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127.
139. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18: 593-620.
140. Baltus T, Weber KS, Johnson Z, Proudfoot AE, Weber C (2003) Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium. *Blood* 102: 1985-1988.
141. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745-763.
142. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH (2001) Migratory Properties of Naive, Effector, and Memory Cd8+ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 953-966.
143. Viola A, Luster AD (2008) Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 171-197.
144. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR (1998) The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101: 746-754.
145. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A (1998) Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187: 875-883.
146. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8: 639-646.
147. Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, Luster AD (2007) CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 204: 1327-1334.
148. Schneider MA, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A (2007) CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 204: 735-745.
149. Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA (2006) CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med* 203: 2451-2460.
150. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD (2008) Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 9: 970-980.
151. Scimone ML, Felbinger TW, Mazo IB, Stein JV, von Andrian UH, Weninger W (2004) CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 199: 1113-1120.
152. Worbs T, Mempel TR, Bolter J, von Andrian UH, Forster R (2007) CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 204: 489-495.
153. Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, Hay JB, Butcher EC (2005) Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nature Immunology* 6: 889-894.
154. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD (2005) Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature Immunology* 6: 895-901.
155. Marchesi VT, Gowans JL (1964) The Migration Of Lymphocytes Through The Endothelium Of Venules In Lymph Nodes: An Electron Microscope Study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159: 283-290.

156. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189: 451-460.
157. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG (2000) Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12694-12699.
158. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595-599.
159. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-673.
160. Ugolini S, Moulard M, Mondor I, Barois N, Demandolx D, Hoxie J, Brelot A, Alizon M, Davoust J, Sattentau QJ (1997) HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 159: 3000-3008.
161. Syrbe U, Siveke J, Hamann A (1999) Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol* 21: 263-285.
162. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW (1999) CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6873-6878.
163. Ruth JH, Rottman JB, Katschke KJ, Jr., Qin S, Wu L, LaRosa G, Ponath P, Pope RM, Koch AE (2001) Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 44: 2750-2760.
164. Danese S, Gasbarrini A (2005) Chemokines in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 58: 1025-1027.
165. Liehn EA, Zerneck A, Postea O, Weber C (2006) Chemokines: inflammatory mediators of atherosclerosis. *Arch Physiol Biochem* 112: 229-238.
166. el-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL (2002) Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol* 14: 562-568.
167. Cameron MJ, Arreaza GA, Grattan M, Meagher C, Sharif S, Burdick MD, Strieter RM, Cook DN, Delovitch TL (2000) Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J Immunol* 165: 1102-1110.
168. Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC, Alvarez V (2000) CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 1: 288-289.
169. Han SB, Moratz C, Huang NN, Kelsall B, Cho H, Shi CS, Schwartz O, Kehrl JH (2005) Rgs1 and Gnai2 regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles. *Immunity* 22: 343-354.
170. Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102: 635-646.
171. Neptune ER, Iiri T, Bourne HR (1999) Galpha_i is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors. *J Biol Chem* 274: 2824-2828.
172. Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* 77: 83-93.

173. Bach TL, Chen QM, Kerr WT, Wang Y, Lian L, Choi JK, Wu D, Kazanietz MG, Koretzky GA, Zigmond S, Abrams CS (2007) Phospholipase C β 1 is critical for T cell chemotaxis. *J Immunol* 179: 2223-2227.
174. Tan SL, Parker PJ (2003) Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J* 376: 545-552.
175. Cronshaw DG, Kouroumalis A, Parry R, Webb A, Brown Z, Ward SG (2006) Evidence that phospholipase-C-dependent, calcium-independent mechanisms are required for directional migration of T-lymphocytes in response to the CCR4 ligands CCL17 and CCL22. *J Leukoc Biol* 79: 1369-1380.
176. Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, Thelen M (2000) 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. *J Exp Med* 192: 313-324.
177. Jones SA, Moser B, Thelen M (1995) A comparison of post-receptor signal transduction events in Jurkat cells transfected with either IL-8R1 or IL-8R2. Chemokine mediated activation of p42/p44 MAP-kinase (ERK-2). *FEBS Lett* 364: 211-214.
178. Hawkins ED, Russell SM (2008) Upsides and downsides to polarity and asymmetric cell division in leukemia. *Oncogene* 27: 7003-7017.
179. Thelen M (2001) Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2: 129-134.
180. Ogilvie P, Thelen S, Moepps B, Gierschik P, da Silva Campos AC, Baggiolini M, Thelen M (2004) Unusual chemokine receptor antagonism involving a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Immunol* 172: 6715-6722.
181. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, renzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 35760-35766.
182. Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Martinez A (2001) Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol* 22: 612-617.
183. Contento RL, Molon B, Boullaran C, Pozzan T, Manes S, Marullo S, Viola A (2008) CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10101-10106.
184. Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez A, Manes S, Viola A (2005) T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6: 465-471.
185. Babcock GJ, Farzan M, Sodroski J (2003) Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J Biol Chem* 278: 3378-3385.
186. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin de AA, Moreno-Ortiz MC, Martinez A, Mellado M (1999) The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 13: 1699-1710.
187. Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martinez A, Mellado M (1999) The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3628-3633.
188. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de AA, Jones DR, Toran JL, Martinez A (2001) Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J* 20: 2497-2507.

189. Sohy D, Parmentier M, Springael JY (2007) Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J Biol Chem* 282: 30062-30069.
190. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1885-1890.
191. Campanella GS, Grimm J, Manice LA, Colvin RA, Medoff BD, Wojtkiewicz GR, Weissleder R, Luster AD (2006) Oligomerization of CXCL10 is necessary for endothelial cell presentation and in vivo activity. *J Immunol* 177: 6991-6998.
192. Signoret N, Pelchen-Matthews A, Mack M, Proudfoot AE, Marsh M (2000) Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5. *J Cell Biol* 151: 1281-1294.
193. Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24.
194. Chuang TT, Sallèse M, Ambrosini G, Parruti G, De BA (1992) High expression of beta-adrenergic receptor kinase in human peripheral blood leukocytes. Isoproterenol and platelet activating factor can induce kinase translocation. *J Biol Chem* 267: 6886-6892.
195. Vroon A, Kavelaars A, Limmroth V, Lombardi MS, Goebel MU, Van Dam AM, Caron MG, Schedlowski M, Heijnen CJ (2005) G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 174: 4400-4406.
196. Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, Van de PM, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ (1999) Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 13: 715-725.
197. Vroon A, Heijnen CJ, Lombardi MS, Cobelens PM, Mayor F, Jr., Caron MG, Kavelaars A (2004) Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 901-909.
198. Meili R, Ellsworth C, Lee S, Reddy TB, Ma H, Firtel RA (1999) Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium. *EMBO J* 18: 2092-2105.
199. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287: 1037-1040.
200. Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA (2002) Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 109: 611-623.
201. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287: 1049-1053.
202. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709.
203. Merlot S, Firtel RA (2003) Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* 116: 3471-3478.
204. Sinclair LV, Finlay D, Feijoo C, Cornish GH, Gray A, Ager A, Okkenhaug K, Hagenbeek TJ, Spits H, Cantrell DA (2008) Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9: 513-521.

205. Weiner OD, Neilsen PO, Prestwich GD, Kirschner MW, Cantley LC, Bourne HR (2002) A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol* 4: 509-513.
206. Gao P, Wange RL, Zhang N, Oppenheim JJ, Howard OM (2005) Negative regulation of CXCR4-mediated chemotaxis by the lipid phosphatase activity of tumor suppressor PTEN. *Blood* 106: 2619-2626.
207. Wain CM, Westwick J, Ward SG (2005) Heterologous regulation of chemokine receptor signaling by the lipid phosphatase SHIP in lymphocytes. *Cell Signal* 17: 1194-1202.
208. Ward SG (2006) T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol* 27: 80-87.
209. Reif K, Okkenhaug K, Sasaki T, Penninger JM, Vanhaesebroeck B, Cyster JG (2004) Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* 173: 2236-2240.
210. Jarmin SJ, David R, Ma L, Chai JG, Dewchand H, Takesono A, Ridley AJ, Okkenhaug K, Marelli-Berg FM (2008) T cell receptor-induced phosphoinositide-3-kinase p110delta activity is required for T cell localization to antigenic tissue in mice. *J Clin Invest* 118: 1154-1164.
211. Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89: 105-114.
212. Toker A, Newton AC (2000) Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103: 185-188.
213. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88: 435-437.
214. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321.
215. Zimmermann S, Moelling K (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286: 1741-1744.
216. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS (2005) Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 171: 1023-1034.
217. Zhou GL, Tucker DF, Bae SS, Bhatheja K, Birnbaum MJ, Field J (2006) Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *J Biol Chem* 281: 36443-36453.
218. Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Demont Y, Slomianny C, Antol J, Lemoine J, Hondermarck H (2007) Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Mol Cell Proteomics* 6: 114-124.
219. Stambolic V, Woodgett JR (2006) Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* 16: 461-466.
220. Kolsch V, Charest PG, Firtel RA (2008) The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci* 121: 551-559.
221. Smit MJ, Verdijk P, van der Raaij-Helmer EM, Navis M, Hensbergen PJ, Leurs R, Tensen CP (2003) CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood* 102: 1959-1965.

222. Nguyen KD, Vanichsarn C, Fohner A, Nadeau KC (2009) Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25(hi)CD127(lo)/(-) regulatory T cells in human allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123: 933-939.
223. Webb A, Johnson A, Fortunato M, Platt A, Crabbe T, Christie MI, Watt GF, Ward SG, Jopling LA (2008) Evidence for PI-3K-dependent migration of Th17-polarized cells in response to CCR2 and CCR6 agonists. *J Leukoc Biol* 84: 1202-1212.
224. Waugh C, Sinclair L, Finlay D, Bayascas JR, Cantrell D (2009) Phosphoinositide (3,4,5)-Triphosphate Binding to Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 Regulates a Protein Kinase B/Akt Signaling Threshold That Dictates T-Cell Migration, Not Proliferation. *Mol Cell Biol* 29: 5952-5962.
225. Turcovski-Corrales SM, Fenton RG, Peltz G, Taub DD (1995) CD28:B7 interactions promote T cell adhesion. *Eur J Immunol* 25: 3087-3093.
226. Kaga S, Ragg S, Rogers KA, Ochi A (1998) Stimulation of CD28 with B7-2 promotes focal adhesion-like cell contacts where Rho family small G proteins accumulate in T cells. *J Immunol* 160: 24-27.
227. Salazar-Fontana LI, Barr V, Samelson LE, Bierer BE (2003) CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol* 171: 2225-2232.
228. Secchiero P, Zella D, Curreli S, Mirandola P, Capitani S, Gallo RC, Zauli G (2000) Engagement of CD28 modulates CXC chemokine receptor 4 surface expression in both resting and CD3-stimulated CD4+ T cells. *J Immunol* 164: 4018-4024.
229. Riley JL, Schlienger K, Blair PJ, Carreno B, Craighead N, Kim D, Carroll RG, June CH (2000) Modulation of susceptibility to HIV-1 infection by the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 costimulatory molecule. *Journal of Experimental Medicine* 191: 1987-1997.
230. Mustelin T (2006) Restless T cells sniff and go. *Science* 313: 1902-1903.
231. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY (1990) Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250: 1720-1723.
232. Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR (1998) Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76: 34-40.
233. Chambers CA, Cado D, Truong T, Allison JP (1997) Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9296-9301.
234. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11: 231-238.
235. Leitenberg D, Bottomly K (1999) Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Semin Immunol* 11: 283-292.
236. Dotan I, Werner L, Vigodman S, Weiss S, Brazowski E, Maharshak N, Chen O, Tulchinsky H, Halpern Z, Guzner-Gur H (2009) CXCL12 Is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system. *Inflamm Bowel Dis*
237. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405-413.
238. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA (1996) CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183: 2541-2550.

239. Ariel A, Yavin EJ, Hershkoviz R, Avron A, Franitza S, Hardan I, Cahalon L, Fridkin M, Lider O (1998) IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase
9. *J Immunol* 161: 2465-2472.
240. Knieke K, Hoff H, Maszyna F, Kolar P, Schrage A, Hamann A, Debes GF, Brunner-Weinzierl MC (2009) CD152 (CTLA-4) determines CD4 T cell migration in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 4: e5702.
241. Honczarenko M, Douglas RS, Mathias C, Lee B, Ratajczak MZ, Silberstein LE (1999) SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells
8. *Blood* 94: 2990-2998.
242. Iwasaki M, Mukai T, Gao P, Park WR, Nakajima C, Tomura M, Fujiwara H, Hamaoka T (2001) A critical role for IL-12 in CCR5 induction on T cell receptor-triggered mouse CD4(+) and CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 31: 2411-2420.
243. Girvin AM, Dal Canto MC, Rhee L, Salomon B, Sharpe A, Bluestone JA, Miller SD (2000) A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J Immunol* 164: 136-143.
244. Mirenda V, Jarmin SJ, David R, Dyson J, Scott D, Gu Y, Lechler RI, Okkenhaug K, Marelli-Berg FM (2007) Physiologic and aberrant regulation of memory T-cell trafficking by the costimulatory molecule CD28. *Blood* 109: 2968-2977.
245. Salomon B, Bluestone JA (2001) Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19: 225-252.
246. Chambers CA, Kuhns MS, Allison JP (1999) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4(+) T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8603-8608.
247. Bromley SK, Peterson DA, Gunn MD, Dustin ML (2000) Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* 165: 15-19.
248. Dustin ML, Springer TA (1989) T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341: 619-624.
249. Bleul CC, Schultze JL, Springer TA (1998) B Lymphocyte Chemotaxis Regulated in Association with Microanatomic Localization, Differentiation State, and B Cell Receptor Engagement. *J Exp Med* 187: 753-762.
250. Fedyk ER, Ryyan DH, Ritterman I, Springer TA (1999) Maturation decreases responsiveness of human bone marrow B lineage cells to stromal-derived factor 1 (SDF-1). *J Leukoc Biol* 66: 667-673.
251. Shen H, Cheng T, Olszak I, Garcia-Zepeda E, Lu Z, Herrmann S, Fallon R, Luster AD, Scadden DT (2001) CXCR-4 Desensitization Is Associated with Tissue Localization of Hemopoietic Progenitor Cells. *J Immunol* 166: 5027-5033.
252. Palmesino E, Moepps B, Gierschik P, Thelen M (2006) Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells. *Immunobiology* 211: 377-389.
253. Debes GF, Hopken UE, Hamann A (2002) In vivo differentiated cytokine-producing CD4(+) T cells express functional CCR7. *Journal of Immunology* 168: 5441-5447.
254. Bowman EP, Campbell JJ, Druey KM, Scheschonka A, Kehrl JH, Butcher EC (1998) Regulation of chemotactic and proadhesive responses to chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members. *J Biol Chem* 273: 28040-28048.

255. Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H (1999) Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96: 667-676.
256. Ali H, Richardson RM, Haribabu B, Snyderman R (1999) Chemoattractant receptor cross-desensitization. *J Biol Chem* 274: 6027-6030.
257. Gomez TS, Billadeau DD (2008) T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv Immunol* 97: 1-64.
258. Offner H, Buenafe AC, Vainiene M, Celnik B, Weinberg AD, Gold DP, Hashim G, Vandenberg AA (1993) Where, when, and how to detect biased expression of disease-relevant V beta genes in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 151: 506-517.
259. Brunner-Weinzierl MC, Hoff H, Burmester GR (2004) Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy* 6: 45-54.
260. Okamoto N, Nukada Y, Tezuka K, Ohashi K, Mizuno K, Tsuji T (2004) AILIM/ICOS signaling induces T-cell migration/polarization of memory/effector T-cells. *Int Immunol* 16: 1515-1522.
261. Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Brocker T, Raykundalia C, Goodall M, Forster R, Lipp M, Lane P (1999) Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J Exp Med* 190: 1115-1122.
262. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 653-692.
263. Pitcher JA, Tesmer JJ, Freeman JL, Capel WD, Stone WC, Lefkowitz RJ (1999) Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 274: 34531-34534.
264. Ward SG, Marelli-Berg FM (2009) Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J* 418: 13-27.
265. Shahabi NA, McAllen K, Sharp BM (2008) Stromal cell-derived factor 1-alpha (SDF)-induced human T cell chemotaxis becomes phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-independent: role of PKC-theta. *J Leukoc Biol* 83: 663-671.
266. Cronshaw DG, Owen C, Brown Z, Ward SG (2004) Activation of phosphoinositide 3-kinases by the CCR4 ligand macrophage-derived chemokine is a dispensable signal for T lymphocyte chemotaxis. *J Immunol* 172: 7761-7770.
267. Smith A, Carrasco YR, Stanley P, Kieffer N, Batista FD, Hogg N (2005) A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* 170: 141-151.
268. Parent CA, Blacklock BJ, Froehlich WM, Murphy DB, Devreotes PN (1998) G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* 95: 81-91.
269. Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R, Sixt M (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453: 51-55.
270. Woolf E, Grigorova I, Sagiv A, Grabovsky V, Feigelson SW, Shulman Z, Hartmann T, Sixt M, Cyster JG, Alon R (2007) Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol* 8: 1076-1085.

271. Stein JV, Rot A, Luo Y, Narasimhaswamy M, Nakano H, Gunn MD, Matsuzawa A, Quackenbush EJ, Dorf ME, von Andrian UH (2000) The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med* 191: 61-76.
272. Murdoch C (2000) CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev* 177:175-84.: 175-184.
273. Mackay CR (2001) Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2: 95-101.
274. Weninger W, Carlsen HS, Goodarzi M, Moazed F, Crowley MA, Baekkevold ES, Cavanagh LL, von Andrian UH (2003) Naive T cell recruitment to nonlymphoid tissues: A role for endothelium-expressed CC chemokine ligand 21 in autoimmune disease and lymphoid neogenesis. *Journal of Immunology* 170: 4638-4648.
275. Reape TJ, Rayner K, Manning CD, Gee AN, Barnette MS, Burnand KG, Groot PHE (1999) Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques. *American Journal of Pathology* 154: 365-374.
276. Hjelmstrom P, Fjell J, Nakagawa T, Sacca R, Cuff CA, Ruddle NH (2000) Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation. *American Journal of Pathology* 156: 1133-1138.
277. Bielecki B, Mazurek A, Wolinski P, Glabinski A (2007) Expression of chemokine receptors CCR7 and CCR8 in the CNS during ChREAE. *Scand J Immunol* 66: 383-392.
278. Hamann, A. and Engelhardt, B. (2005) *Leukocyte trafficking*, 1. Aufl.: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
279. Pease JE, Horuk R (2009) Chemokine receptor antagonists: part 2. *Expert Opin Ther Pat* 19: 199-221.
280. Rommel C, Camps M, Ji H (2007) PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?. *Nat Rev Immunol* 7: 191-201.
281. Mackay CR (2008) Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol* 9: 988-998.
282. Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J* 275: 4448-4455.
283. Lonsdorf AS, Hwang ST, Enk AH (2009) Chemokine receptors in T-cell-mediated diseases of the skin. *J Invest Dermatol* 129: 2552-2566.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Monika C. Brunner-Weinzierl bedanken. Sie hat nicht nur meine Doktorarbeit am DRFZ und an der Universität Magdeburg betreut. Durch stete Hilfe und Ermunterung hat sie entscheidend dazu beigetragen, dass ich dieses Promotionsprojekt begonnen und zu Ende gebracht habe.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch den Labor-Managerinnen, den Informatikern und den Mitarbeitern verschiedener Service-Einrichtungen am DRFZ, die mit guter Laune, guten Tipps und guter Arbeit zur Stelle waren.

Kaum vorstellbar wäre der Abschluss dieser Arbeit ohne meine Kollegin Marion Rudolph, die mir in Phasen der größten Not und Frustration die wichtigste Hilfe war und mir bis zum letzten Gegenlesen die Treue gehalten hat. Dr. Holger Hoff hat mir ebenso intensiv geholfen – bei der Diskussion über mein Projekt und beim Gegenlesen der fertigen Arbeit. Dass er aus dem fernen Mainz so engagiert war, ist ihm umso höher anzurechnen.

Weniger freiwillig, aber dafür umso opferbereiter war die Rolle der Mäuse, die für diese Forschungsarbeit ihr kostbares Leben lassen mussten. Ohne sie wäre der Fortschritt in dieser Forschung nicht machbar.

Die Liste der Opfer meiner Arbeit wäre nicht vollständig, wenn ich nicht meine Familie nennen würde. Mein lieber Ralf sowie meine Kinder Janne und Hannes haben die Höhen und Tiefen eines Forscherlebens weitgehend klaglos ertragen und das phasenweise Verschwinden ihrer Frau und Mutter in den Tiefen der Grundlagenforschung ausgesessen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Karin Knieke, geb. 27.11.1963 in Bielefeld, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

Einfluss von CD152-Signalen auf das Migrationsverhalten von T_H1-Lymphozyten

selbstständig verfasst und nicht schon als Dissertation verwendet habe. Alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium an einer anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg in der Fassung vom 21.12.2005 ist mir bekannt.

Berlin, den 14.07.2010

.....

Karin Knieke

Publikationsliste

Kolar, P., Hoff, H., Knieke, K., Burmester, G.-R., and Brunner-Weinzierl, M.C. 2009. CTLA- (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells. *Arthritis and Rheumatism* 60:123-132.

Hegel, J.K., Knieke, K., Kolar, P., Reiner, S., and Brunner-Weinzierl, M.C. 2009. CD152 engagement regulates IFN γ expression of individual CD8 T cells by selectively utilizing Eomesodermin. *Eur. J. Immunol.* 39:883-893.

Knieke, K., Hoff, H., Quandt, D., Kolar, P., and Brunner-Weinzierl, M.C. 2009. CD152 (CTLA-4) determines CD4 T cell migration in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 4:e5702.

Hoff, H., Knieke, K., Cabail, Z., Hirseland, H., Vratsanos, G., Burmester, G., Nadler, S.G., Bröker, B., Hebel, K., and Brunner-Weinzierl, M.C. 2009. Surface CD152 (CTLA-4) expression and signaling dictates longevity of CD28null T cells. *J. Immunol.* 182: 5342-5351.