

Charakterisierung von murinen CXCR5 positiven T_{FH}-Zellen

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Humanbiologin Svenja Hardtke

Geboren am 28.12.1975 in Wilhelmshaven

2006

Referent: Prof.Dr.R.Förster
Korreferent: Prof.Dr.R.Schwinzer
Tag der Promotion: 13.Dezember 2005

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
ABSTRACT	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren	1
1.1.1 Chemokine	1
1.1.2 Chemokinrezeptoren	2
1.2 Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellsubpopulationen	4
1.3 Die Funktion von Chemokinen	6
1.3.1 Migration in sekundären lymphatischen Organe	6
1.4 Strukturierung und Entwicklung lymphatischer Organe	8
1.5 B-Zellaktivierung durch T-Helferzellen	10
1.6 Die Keimzentrumsreaktion	11
1.7 CXCR5 positive T _{FH} -Zellen	12
1.7.1 CXCR5-Expression auf T-Zellen der Maus	13
1.8 Aufgabenstellung	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Laborgeräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Gebrauchsfertige Reagenzien	17
2.1.5 Adjuvantien	17
2.1.6 Medien und Seren	17
2.1.7 Puffer und Lösungen	18
2.1.8 Antikörper und Konjugate	19
2.2 Methoden	22
2.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen	22
2.2.2 Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE	22
2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse von Chemokinrezeptoren	23
2.2.4 Färbung intrazellulärer Zytokine	23
2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten	24
2.2.6 <i>In vivo</i> Färbung von CXCR5	25
2.2.7 Zellsortierung	25
2.2.8 Adoptiver Zelltransfer	25
2.2.9 Adoptiver Transfer von B- und T-Zellen :	26
2.2.10 ELISA	27
2.2.11 <i>In-vitro</i> -Migration (Transwell)	27
2.2.12 Mikroarray-Analyse von T-Zellpopulationen	28
2.2.12.1 Gewinnung und Aufreinigung der Zellpopulationen	28
2.2.12.2 RNA Aufarbeitung und Mikroarray mit dem Agilent „Whole Mouse Genome Oligo Mikroarray“ Chip (44k)	29
2.2.12.3 Auswertung der Mikroarray Daten	29

3	ERGEBNISSE	30
3.1	CXCR5-Expression auf aktivierten T-Lymphozyten	30
3.2	Lokalisation der transferierten Zellen im Lymphknoten	35
3.3	Transferierte CXCR5 positive T-Zellen exprimieren auch CCR7	37
3.3.1	CXCR5-Expression	37
3.3.2	<i>In vitro</i> Migration von naiven und aktivierten T-Zellen.....	39
3.3.3	<i>In vivo</i> Migration innerhalb lymphatischer Organe.....	40
3.4	<i>In vivo</i> B-Zellhilfe durch CXCR5 ^{-/-} T-Zellen ist stark vermindert	44
3.5	CXCR5 defiziente T-Zellen unterscheiden sich bezüglich aktivierungsspezifischer Oberflächen-Moleküle und der Zytokin-produktion nicht von wt-Zellen.....	47
3.6	B-Zellaktivierung und Klassenwechsel in CXCR5 ^{-/-} Mäusen	49
3.7	CXCR5 exprimierende T-Zellen in den Peyerschen Platten des Dünndarms	51
3.7.1	T _{FH} -phänotypische Marker auf CXCR5 positiven T-Zellen aus PP.....	54
3.8	Vergleich von CXCR5 exprimierenden Zellen aus LN und PP mittels Mikroarray	56
4	DISKUSSION	59
4.1	Phänotypische Marker von T _{FH} -Zellen	60
4.2	Mikroarrayanalyse	61
4.2.1	Handelt es sich bei den CXCR5 ⁺ Zellen aus den PP um Effektor-Gedächtniszellen? ...	61
4.2.2	CXCR5 ⁺ Zellen im peripheren Lymphknoten	63
4.3	Die Expression von CXCR5 auf aktivierten transferierten T-Zellen	66
4.3.1	„Balanced responsiveness“ von CCR7 und CXCR5 auch auf T-Zellen?.....	67
4.4	Funktion von T _{FH} -Zellen.....	69
	LITERATURVERZEICHNIS	72
	ANHANG	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Zellsubpopulationen	5
Abb. 1.2	Mehrstufen-Modell der Lymphozyten-Migration über HEVs in lymphatische Organe.....	7
Abb. 1.3	Aufbau eines Lymphknotens und einer Peyerschen Platte.....	10
Abb. 3.1	CXCR5-Expression auf adoptiv transferierten DO11.10 T-Zellen	32
Abb. 3.2	CXCR5, CCR7 und P-Sel.Ligand Expression auf DO11.10 T-Zellen vier Tage nach Aktivierung ...	33
Abb. 3.3	CXCR5 und CCR7-Expression nach Immunisierung mit OVA und Poly I:C	34
Abb. 3.4	CXCR5 ^{-/-} können nicht in die B-Zellfollikel migrieren.....	36
Abb. 3.5	Steigende CXCR5-Expression nach T-Zellaktivierung	38
Abb. 3.6	Reduzierte Migration auf CCL21 nach T-Zellaktivierung	39
Abb. 3.7	Die Expression von CXCR5 und CCR7 bestimmt die Lokalisation innerhalb des LN.....	41
Abb. 3.8	Lokalisation transferierter Zellen in <i>plt/plt</i> -Mäusen.....	43
Abb. 3.9	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	44
Abb. 3.10	CXCR5 ^{-/-} T-Zellen zeigen <i>in vivo</i> eine verminderte Fähigkeit B-Zellhilfe zu geben	46
Abb. 3.11	CXCR5 ^{-/-} T-Zellen produzieren die gleichen Menge an Zytokinen wie wt-Zellen	48
Abb. 3.12	Verminderte IgG Sezernierung CXCR5 defizienten Mäusen	50
Abb. 3.13	Lage der T-Zellen in PP und LN	51
Abb. 3.14	CCR7 und CXCR5-Expression auf CD4 ⁺ T-Zellen in PP und LN	52
Abb. 3.15	CXCR5 <i>in vivo</i> Färbung in PP	53
Abb. 3.16	CXCR5 ⁺ Zellen aus PP exprimieren ICOS, OX40 und CD40L.....	55
Tabelle 1.1	Chemokinrezeptoren	3
Tabelle 3.1	Signifikant erhöhte Gene auf CXCR5 positiven T-Zellen aus PP.....	57
Tabelle 3.2	Signifikant erhöhte Gene auf transferierten, aktivierten OT-II CXCR5 positiven T-Zellen des drainierenden LN	58

APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APC	Allophycocyanin
BALT	<i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BSA	Rinderalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CCR / CXCR	Chemokinrezeptor
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CFSE	5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CT	Cholera Toxin
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Indodicarbocyanin
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dest.	destilliert
dr	drainierend
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbend assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning</i>
FC	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	Fötale Kälber Serum (<i>fetal calf serum</i>)
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GC	Keimzentrum (<i>germinal center</i>)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein coupled receptor</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonic acid
HEVs	high endothelial venules
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
ICOS	Induzierbarer Kostimulator (<i>inducible costimulator</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
L	Ligand
LN	Lymphknoten (<i>lymph node</i>)
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissues</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Mausserum
OVA	Ovalbumin
PALS	<i>periarteriolar lymphoid sheath</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin

PerCp	Peridin Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
<i>plt</i>	Mausstamm (<i>paucity of lymph node T cell</i>)
POX	Peroxidase
PP	Peyersche Platte
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS	Rattenserum
SPF	spezifiziert pathogenfrei
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
T _{FH}	Follikuläre T-Helferzelle
tg	transgen
T _H	T-Helfer-Zelle
TNP	tri-Nitrophenol
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems besteht darin, eingedrungene Pathogene schnell und effektiv zu bekämpfen. Ein entscheidendes Ereignis im Verlauf einer erworbenen Immunantwort stellt die Interaktion verschiedener Lymphozytenpopulationen untereinander dar. Ein Beispiel hierfür ist der Kontakt zwischen T- und B-Zellen innerhalb der lymphatischen Organe, in dessen Verlauf es zu einer Aktivierung der B-Zellen und damit zur Antikörperproduktion kommen kann. Die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5 und ihre Liganden CCL19/CCL21 und CXCL13 sind von entscheidender Bedeutung als immunologische Regulatoren der Migration funktionell unterschiedlicher T- und B-Zellen. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei dem Homing von Zellen in die sekundären lymphatischen Organe sondern, wie in der vorliegenden Arbeit für T-Zellen und in vorangegangenen Arbeiten für B-Zellen gezeigt, auch bei der Migration zwischen B-Zellfollikel und T-Zellzone.

Der Chemokinrezeptor CXCR5 wurde ursprünglich als homöostatischer Rezeptor (d.h. Bindung eines konstitutiv exprimierten Liganden) auf B-Zellen beschrieben. Neuere Arbeiten haben jedoch eine kleine Subpopulation CXCR5 exprimierender T-Helferzellen identifiziert, welche sich innerhalb der B-Zellfollikel humaner Tonsillen sowie im Blut befinden. Diese Zellen wurden aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer Fähigkeit, *in vitro* effektive B-Zellhilfe zu geben, „*follicular B helper T cells*“ (T_{FH}) genannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von adoptiven Transferexperimenten mit T-Zellen, welche einen transgenen T-Zellrezeptor für OVAAlbumin exprimieren, die CXCR5-Expression auf aktivierten T-Zellen sowie die CXCR5-vermittelte Migration dieser Zellen in die B-Zellfollikel des drainierenden Lymphknotens (LN) gezeigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass transferierte T-Zellen weiterhin CCR7 exprimieren und diese CCR7-Expression die Zellen solange in der T-Zellzone zurückhält, bis ein bestimmter Schwellenwert an CXCR5-Expression erreicht ist, und die T-Zellen dann dem CXCL13-Signal in die B-Zellfollikel folgen können. *In vivo* B-Zellhilfe-Experimente mit CXCR5 defizienten T-Zellen zeigen, dass die Migration von T-Zellen in die B-Zellfollikel wichtig ist, um eine effiziente Immunglobulinproduktion zu induzieren.

In dieser Arbeit konnte außerdem eine CXCR5 positive T-Zellpopulation in den Peyerschen Platten (PP) identifiziert werden, welche kein CCR7 exprimieren und somit den für T_{FH}-Zellen beschriebenen Phänotyp tragen. Übereinstimmend mit diesem Phänotyp wurde auch, verglichen mit den LN, eine erhöhte Anzahl T-Zellen in den B-Zellfollikeln der PP gefunden.

Um die CXCR5 exprimierenden T-Zellpopulation aus den PP besser zu charakterisieren und sie mit den nach adoptivem Transfer generierten CXCR5⁺ Zellen aus dem LN zu vergleichen, wurde eine vergleichende DNA Mikroarray-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden 371 Gene identifiziert, die signifikant unterschiedlich exprimiert sind, aber nur wenige davon wurden in Studien mit humanen T_{FH}-Zellen als signifikant beschrieben. So zeigt sich, dass Unterschiede in den Expressionsmuster der Zellen aus LN, PP und humanen Tonsillen bestehen. Ob diese auch mit funktionellen Unterschieden verknüpft sind, müssen weitere Analysen zeigen.

Schlagworte: Follikuläre T-Helferzelle, CXCR5, Migration

Abstract

Immune surveillance requires well coordinated mechanisms to guide immune cells through peripheral tissues into secondary lymphoid organs. Within a particular compartment coordinated migration of lymphocytes is the prerequisite for an interaction of T and B cells and thus essential for efficient humoral immune responses. Migration of lymphocytes is mainly controlled by the interaction of the chemokine receptors CCR7 and CXCR5 and their ligands CCL19/CCL21 and CXCL13. In addition to lymphocyte homing into secondary lymphoid organs this study demonstrates that the migration of T cells between T cell zone and B cell follicle is dependent on the expression of CCR7 and CXCR5.

While several mechanisms have been elucidated with regard to the regulation of B cell trafficking within lymphoid organs, less is known about molecular cues that guide the small subpopulation of CXCR5 expressing CD4⁺ follicular B helper T cells (T_{FH}) to B cell follicles. This T cell subpopulation, first described for human tonsils, is known to localize in the B cell follicles and is able to give efficient B cell help *in vitro*.

Using various adoptive transfer experiments with T cells carrying a MHCII-restricted T cell receptor specific for OVAAlbumin (OVA), in this study is now demonstrated *in vivo* that the migration of CD4⁺ T cells into B cell follicles entirely depends on the expression of CXCR5. Also, it shows that expression of CXCR5 is indispensable for T cells to enter B cell follicles while expression of CCR7 provides a counteracting signal to retain activated T cells in the T cell area. Once this T cells are deficient for CCR7, much more activated T cells migrate into the B cell follicles. Furthermore, it is demonstrated that the majority of CXCR5⁺ helper T cells isolated from murine Peyer's patches (PP) lack CCR7 while this receptor is always expressed on CXCR5⁺ T cells generated during an adoptive immune response in peripheral LNs. Interestingly, lack of CCR7 expression is paralleled by a higher frequency of T cells locating to B cell follicles in PP. This indicates that the balanced responsiveness of these cells towards CCR7 and CXCR5 ligands determines their localization into the B or T cell area within the lymph nodes.

Additionally, CXCR5 expressing T cells from PPs share a couple of markers described for human T_{FH} cells. To characterize the phenotype of these two CXCR5⁺ populations, further the Microarray technique was used to compare CXCR5 expressing T cells from PPs with those generated during an adoptive immune response in peripheral LNs. Analysis of the differently expressed genes indicates that both populations did not correspond completely with results

described for human T_{FH} cells, but gave a more detailed description of CXCR5 expressing T cells from different organs.

The results obtained in the present study show the regulation and function of the CXCR5 expression on T cells and beside this describe a CXCR5 expressing T cell population in PP whose function has to be elucidated in further studies.

Key words: follicular T helper cell, CXCR5, migration

1 Einleitung

Die Hauptaufgabe des Immunsystems besteht darin, schnell und effektiv eingedrungene Pathogene, aber auch maligne Körperzellen, zu beseitigen. Die häufigsten Eintrittsorte von Pathogenen sind die Haut, der Gastrointestinaltrakt oder die Lunge. Hierbei handelt es sich um Bereiche des Körpers in denen Zellen des adaptiven Immunsystems, wie T- und B-Zellen unter normalen Bedingungen in sehr geringer Anzahl vorkommen. Naive T-Zellen zirkulieren durch die sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten „lymph node“ (LN), Milz und Peyersche Platten (PP), dort treffen sie auf antigenpräsentierende Zellen (APC), wie dendritische Zellen (DC), welche die eingedrungenen Pathogene in der Peripherie aufgenommen haben und sie dann den T-Zellen präsentieren. Aktivierte T-Zellen können dann ihrerseits als Effektorzellen zum Infektionsherd wandern oder als Helferzellen weitere Zellen aktivieren. Essentiell für eine spezifische Immunreaktion ist somit die Fähigkeit der einzelnen Zellpopulationen, miteinander zu kommunizieren, so dass Gefahrensignale erkannt, Botenstoffe versendet, die generierten Effektorzellen an den Ort der Infektion geleitet werden und auf diese Weise eine spezifische Immunreaktion eingeleitet wird.

1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.1.1 Chemokine

Die Zirkulation von Zellen durch die sekundären lymphatischen Organe, sowie das Vordringen von Effektorzellen zu dem jeweiligen Infektionsherd ist ein gesteuerter Prozess, an dem Adhäsionsmoleküle, wie Integrine und Selektine, sowie Chemokine beteiligt sind.

Chemokine und ihre Rezeptoren werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimiert und spielen neben ihrer Funktion beim gewebespezifischen „Homing“ von Lymphozyten auch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen. Zu den chemokinexprimierenden Zellen zählen Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Fibroblasten, Stromazellen, Epithelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten, glatte Muskelzellen und T-Zellen (Baggiolini, 1998). Der Name Chemokine kommt von der Bezeichnung „*chemotatic cytokine*“ und beschreibt damit die Funktion dieser Moleküle, bei den entsprechenden Zielzellen Chemotaxis auszulösen.

Die ersten Chemokine wurden in Bereichen mit akuter Infektion beschrieben, hier rekrutieren sie Granulozyten, Monozyten, DC und aktivierte T-Zellen. Aus diesem Grund werden sie als

induzierbare (*inflammatory*) Chemokine bezeichnet. Während induzierbare Chemokine maßgeblich an primären Entzündungsreaktionen beteiligt sind, ist eine zweite Gruppe von Chemokinen entscheidend an der homöostatischen Migration von Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe und der Differenzierung des lymphatischen Gewebes beteiligt. Diese Chemokine werden als konstitutive (*homeostatic*) Chemokine bezeichnet, da sie unabhängig von Entzündungssignalen exprimiert werden.

Die Chemokine stellen eine Klasse von kleinen ca. 6 - 14 kD, größtenteils basischen, strukturell verwandten, chemotaktisch wirksamen Zytokinen dar, welche bis jetzt in Säugetieren, Vögeln und Fischen gefunden worden (Zlotnik, 2000). Charakterisiert werden sie durch die Existenz von vier konservierten Zysteinresten in der Aminosäurekette, nach deren Lage sie in vier Familien eingeteilt werden:

die CC-, die CXC-, die CX₃C- und die XC-Chemokine. In der Gruppe der CC-Chemokine liegen die bezeichneten Zysteinreste direkt benachbart, bei den CXC-Chemokinen sind sie durch eine beliebige Aminosäure (X) und bei den CX₃C-Chemokinen durch drei Aminosäuren getrennt. Im Fall der XC-Chemokine fehlt ein Zysteinrest vollständig. Die meisten der für Chemokine kodierenden Gene liegen auf den Chromosomen geclustert vor, welches auf eine enge evolutionäre Verwandtschaft dieser Molekülklasse hinweist. Viele, wenn nicht sogar alle Chemokingene dürften durch Genduplikation aus einem einzigen Vorläufergen entstanden sein (Zlotnik, 2000). Die Wirkung von Chemokinen erfolgt durch Bindung an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Die meisten Chemokine können an mehrere verschiedene Rezeptoren binden, die ihrerseits auch mehrere Agonisten besitzen können. Einige wenige Bindungspaare sind bekannt, bei denen es sich um eine exklusive Bindung handelt (siehe Tabelle 1.1).

1.1.2 Chemokinrezeptoren

Die Chemokinrezeptoren gehören zur Gruppe der 7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren, einer Untergruppe der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCR). Die meisten dieser Rezeptoren vermitteln ihr Signal durch Kopplung an G_{αi}-Proteine und können somit durch Pertussis Toxin inhibiert werden. Die Ligandenbindungsstelle befindet sich bei allen bis heute identifizierten Chemokinrezeptoren an der extrazellulären Domäne (Abb. 1.3). Die Einteilung der Rezeptoren erfolgt aufgrund ihrer Bindungsspezifität: Chemokinrezeptoren, welche CXC-Chemokine binden, werden als CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR) und solche, welche CC-Chemokine binden als CC-Chemokinrezeptoren (CCR) bezeichnet. Bis heute wurden sechs CXC-Rezeptoren, zehn CC-

Rezeptoren und der Rezeptor für Lymphotactin (XCR1) sowie für Fractalkine (CX₃CR1) identifiziert (Zlotnik, 2000). Entsprechend dem Liganden den sie binden, werden die Chemokinrezeptoren in induzierbar und konstitutiv unterteilt (Tabelle 1.1). Arbeiten der letzten Jahre, sowie die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigen jedoch, dass z.B. die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5, welche ursprünglich als konstitutiv exprimiert eingestuft wurden, sehr wohl auch induzierbar sind (Ansel, 1999; Reif, 2002).

Rezeptor	H/I	Ligand	Auf folgenden Zellen exprimiert
CCR1	I	CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14, CCL15, CCL23	Mo, iDC, T, Neu, Eo, Thrombozyten
CCR2	I	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13	Mo, iDC, Ba, T, Nk, Endothelzellen, Fibroblast
CCR3	I	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL24, CCL26	Eo, Ba, T _{H2} , iDC, Thrombozyten
CCR4	H	CCL17, CCL22	iDC, Ba, T _{H2} , Thrombozyten
CCR5	I	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14	T _{H1} , iDC, mDC, Mo, Nk, Thymozyten
CCR6	H	CCL20	iDC, B, T, LC
CCR7	H/I	CCL19, CCL21	naive T-Zellen, "central memory" T-Zellen, B, mDC
CCR8	I	CCL1, CCL16	Mo, B, T, Thymozyten
CCR9	H	CCL25	T, Thymozyten
CCR10	H	CCL27, CCL28	T, Melanozyte, Endothelzellen, Fibroblast, LC
CCR11	H	CCL19, CCL21, CCL25	Astrozyten
CXCR1	I	CXCL5, CXCL6, CXCL8,	Neu, Mo, Astrozyten, Endothel
CXCR2	I	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL7, CXCL8,	Neu, Mo, Astrozyten, Endothel
CXCR3	I	CXCL9, CXCL10, CXCL11,	T _{H1} , B, mesangial cell,
CXCR4	H	CXCL12	Mo, iDC, mDC, Neu, T, B
CXCR5	H/I	CXCL13	B, Astrozyten, "follicular T helper cell"
CXCR6	I	CXCL16	T _{H1}
CX3CR1	I	XCL1, XCL2	T
XCR1	I	CX3L1	Astrozyten, NK, T

TABELLE 1.1 CHEMOKINREZEPTOREN

Tabellarische Auflistung der Chemokinrezeptoren und ihrer Agonisten, die Einteilung in "homeostatic" (H) oder "inflammatory" (I), sowie Zellpopulationen auf deren Oberfläche die Rezeptoren exprimiert werden. B, B- Zellen; Ba, Basophile; Eo, Eosinophile; iDC, „immature“ (unreife) dendritische Zellen; LC, Langerhans Zellen; mDC, „mature“ (reife) dendritische Zellen; Mo, Monozyten; Neu, Neutrophile; Nk, „natural killer“ Zellen; T, T -Zellen; T_H, T -Helferzellen

1.2 Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellsubpopulationen

Die T-Zellen, nach dem Ort ihrer Reifung, dem Thymus, benannt, entwickeln sich aus Knochenmark-Vorläuferzellen zu Thymozyten. Diese werden dann im Thymus in einigen streng regulierten Entwicklungsschritten zu reife T-Zellen. Reife, naive T-Zellen zirkulieren nach dem Verlassen des Thymus durch den Körper und können in den T-Zellregionen der sekundären lymphatischen Organe durch Antigenkontakt bei gleichzeitiger Kostimulation aktiviert werden (Perrin, 1997).

Handelt es sich um CD4 positive T-Zellen, proliferieren sie nach Stimulation durch T-Zellrezeptor-Engagement über MHC-Klasse-II-Moleküle und gleichzeitiger Kostimulation, produzieren Interleukin-2 (IL-2) (Ledbetter, 1985) und werden zu unreifen T-Effektorzellen (T_{H0} -Zelle), welche sich zu reifen T_{H1} - oder T_{H2} -Zellen entwickeln können (Moser, 2000) (Abb. 1.1). CD8⁺ T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung eine MHC-Klasse-I/Peptid:TCR-Interaktion und eine starke Kostimulation durch dendritische Zellen oder eine gleichzeitige Stimulation von CD4⁺ T-Zellen (Inaba, 1987; Young, 1990).

Die Unterscheidung unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen wurde durch die Entdeckung, dass sie verschiedene Chemokinrezeptoren exprimieren vereinfacht (Abb. 1.1). Naive T-Zellen exprimieren CCR7 auf ihrer Oberfläche. Diese CCR7-Expression, zusammen mit der Expression bestimmten Integrine und Selektine, ermöglicht es ihnen, aus dem Blut in die peripheren lymphatischen Organe zu migrieren. Reife T-Zellen regulieren in der Regel CCR7 sowie L-Selektin herunter und verlassen das lymphatische Organ als Effektor- oder Gedächtnis-(*memory*) Zelle. Die T-Zellen, welche als Effektorzellen in die Peripherie auswandern, weisen oft eine verstärkte P-Selektin-Ligand oder CXCR3-Expression auf.

Naive T-Zellen können sich nach Antigenkontakt des weiteren zu Gedächtnis-T-Zellen entwickeln, welche durch verschiedene Marker identifiziert werden können (beim Menschen CD45RO) und sich vor allem durch eine niedrigere Aktivierungsschwelle und somit beim wiederholten Antigenkontakt durch eine schnelle und effiziente Antwort auszeichnen (Sprent, 1973; Sanders, 1988; Wallace, 1990). Gedächtnis-T-Zellen können anhand des Chemokinrezeptors CCR7 in zwei Subpopulationen unterteilt werden. Die eine Population exprimiert wie die naiven Zellen CCR7 und L-Selektin und wird als „*central memory cells*“ (T_{CM}) bezeichnet und die zweite Subpopulation, welche diese beiden Marker wie eine Effektorzelle herunterreguliert als „*effector memory cell*“ (T_{EM}).

Aktivierete CD4 positive T-Zellen werden in die zwei Hauptpopulationen T_{H1} und T_{H2} unterschieden. Die T_{H1} -Zellen sind auf die Abwehr intrazellulärer Pathogene, wie Viren und

einige Bakterien spezialisiert und sezernieren hauptsächlich IFN- γ und IL-12, während T_{H2}-Zellen an der Abwehr großer extrazellulärer Pathogene wie Parasiten, durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13, beteiligt sind (Mackay, 2000). Bevor 1997 Sallusto et al. und 1998 O'Garra et al. zeigen konnten, dass sich diese beiden T-Zellsubpopulationen anhand ihrer Chemokinrezeptorexpression unterscheiden lassen, konnte dies nur über das Zytokinprofil geschehen (Sallusto, 1997; O'Garra, 1998).

CD4 positive T-Zellen regulieren nach ihrer Aktivierung eine ganze Anzahl an Rezeptoren hoch, viele werden zur effektiven Kostimulation benötigt, einige andere zur Migration. Ein weiterer Rezeptor, welcher auf aktivierten T-Zellen heraufreguliert wird, ist der Chemokinrezeptor CXCR5, welcher hauptsächlich auf B-Zellen exprimiert wird (Forster, 1994; Forster, 1996; Ansel, 1999; Schaerli, 2001). Diese weitere T-Zellsubpopulation wurde aufgrund ihrer Fähigkeit B-Zellhilfe zu geben und der Tatsache, dass sie innerhalb der B-Zellfollikel humaner Tonsillen gefunden wurde „*T follicular helper cells*“ (T_{FH}) genannt (Breitfeld, 2000; Schaerli, 2000). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die Einteilung der T-Zellsubpopulationen bezüglich ihrer Chemokinrezeptorexpression.

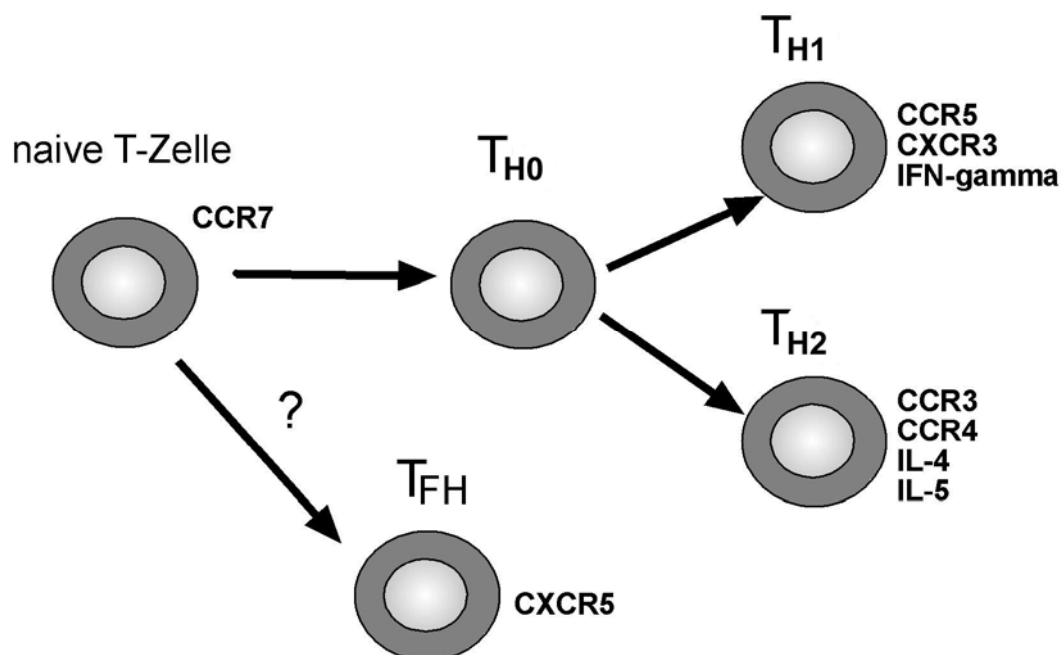


Abb. 1.1 Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Zellsubpopulationen
(modifiziert: nach (Mackay, 2000))

1.3 Die Funktion von Chemokinen

Aufgrund der Vielzahl von chemokinexprimierenden Zellen und Chemokine sind auch die durch Chemokine induzierten Vorgänge sehr mannigfaltig. Sie sind an der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten im Verlauf einer Entzündungsreaktion beteiligt (Moser, 1998), der Angiogenese (Moore, 1998), Entwicklung von lymphatischen Organen (Cyster, 2003) und an der Migration innerhalb der sekundären lymphatischen Organe und der T Zell- vermittelten Immunantwort (Cyster, 1999).

1.3.1 Migration in sekundären lymphatischen Organe

Ein besonderes Merkmal des Immunsystems ist die ständige Zirkulation der Lymphozyten über die Blutgefäße und Lymphbahnen. Hierdurch wird sichergestellt, dass die durch Reifung und Differenzierung entstandenen antigenspezifischen Lymphozyten überall im Organismus zur Pathogenerkennung und -bekämpfung zur Verfügung stehen. Diese ständige Zirkulation ist eine der Grundvoraussetzungen für ein funktionierendes Immunsystem.

Die Einwanderung der Lymphozyten in die Lymphknoten oder die Peyerschen Platten des Darms erfolgt über Venolen mit hohem kubischen Epithel: den HEVs. Dieser Vorgang wird als ein „Mehrstufen-Modell“ beschrieben (Springer, 1995) (Abb. 1.2). Der erste Schritt dieses vierstufigen Prozess besteht aus der Verringerung der Geschwindigkeit der Lymphozyten durch den Kontakt mit den Zellen des hohen Epithels. Dies wird durch schwache, reversible Bindungen von Selektinen und deren Liganden vermittelt.

Im Speziellen handelt es sich hierbei auf den Lymphozyten um L-Selektin, welches an MAdCAM-1 (mesenterischer LN und PP) und P- und E-Selektin auf den Endothelzellen bindet. Im zweiten und dritten Schritt kommt es zu einer Integrin vermittelten festen Anheftung der Lymphozyten am Endothel. Integrinexpression auf Lymphozyten, wie Integrin $\alpha_L\beta_2$ (bei der Migration in periphere LN) bzw. Integrin $\alpha_4\beta_7$ (Migration in die PP), wird durch Chemokine, die auf dem Endothel exprimiert werden, induziert (Springer, 1995). Die wichtigsten an diesem Prozess beteiligten Chemokine sind CCL21 und CCL19, welche an den CC-Chemokinezeptor-7 binden und die Integrin-vermittelte Adhäsion von naiven Lymphozyten an die HEVs vermitteln. CCL21 wird direkt von den HEV-Zellen exprimiert, während CCL19 vor allem von dendritischen Zellen und Stromazellen in der T-Zellzone der LN und der Milz produziert und auf der luminalen Seite der HEVs präsentiert wird (Luther,

2000). Der vierte und letzte Schritt besteht aus dem Einwandern der Zellen an interzellulären Kontaktstellen in die darunter liegenden Bereiche. Diese Diapedese findet durch eine weitere Interaktion von Selektinen (L-Selektin) und Integrinen mit MAdCAM statt.

Die Bedeutung der CCR7–CCL21-Interaktion bei der Migration von T-Lymphozyten konnte mit Hilfe der CCR7 defizienten Maus gezeigt werden (Forster, 1999). Dieser Mausstamm zeigt eine sehr stark verminderte Migration naiver Lymphozyten in LN und PP. Des Weiteren zeigt auch die *plt/plt*- Maus (*paucity of lymph node T cells*) mit einer autosomal rezessiven Mutation im SLC-Gen sehr stark reduzierte Migration (Gunn, 1999).

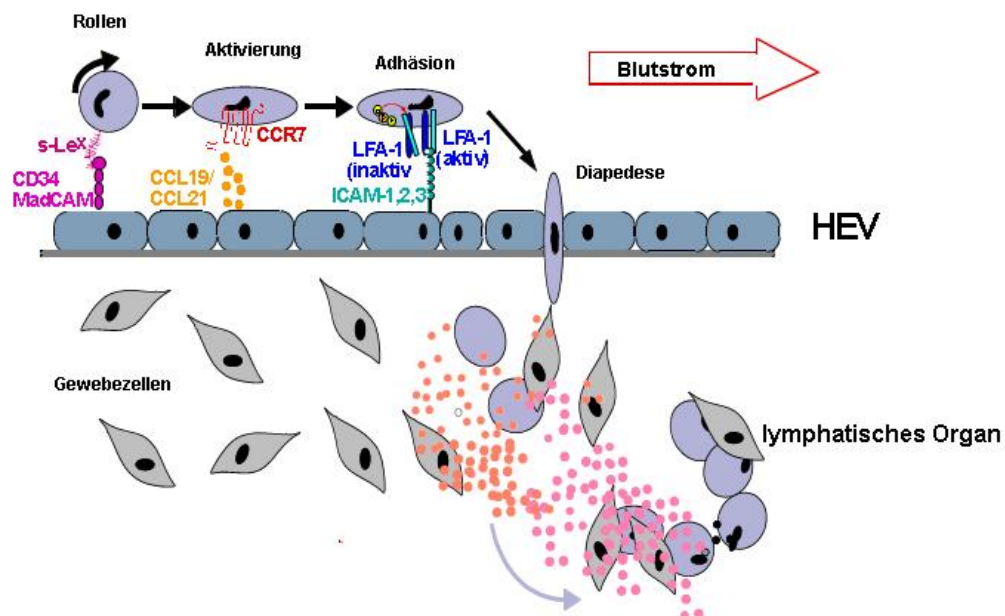


Abb. 1.2 Mehrstufen-Modell der Lymphozyten-Migration über HEVs in lymphatische Organe (modifiziert: nach R.Förster)

1.4 Strukturierung und Entwicklung lymphatischer Organe

Das Immunsystem des Körpers setzt sich neben der Vielzahl unterschiedlicher Zellpopulationen aus mehreren lymphatischen Organen zusammen, welche sich in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterscheiden lassen. Zu den primären lymphatischen Organen gehören das Knochenmark und der Thymus. Hier findet die Entwicklung von Lymphozyten statt.

Die sekundären lymphatischen Organe des Immunsystems können, zusammen mit den jeweils spezifisch durch sie hindurch zirkulierenden Subpopulationen von Lymphozyten, in mehrere räumlich und funktionell unterschiedliche Kompartimente eingeteilt werden:

Die wichtigsten Bestandteile des sekundären Immunsystems sind die Lymphknoten und die Milz. Hier befindet sich zum einen der Großteil der nicht zirkulierenden Lymphozyten, zum anderen findet hier der Kontakt zwischen antigenpräsentierender Zelle und B- bzw. T-Lymphozyt statt und somit gegebenenfalls die Initialisierung der T-zellabhängigen B-Zellantwort. Die Interaktion von T- und B-Zellen innerhalb eines Lymphknotens wird in Abschnitt 1.5 noch eingehend erläutert.

Afferente lymphatische Gefäße leiten die Lymphe aus den umliegenden Geweben in die drainierenden Lymphknoten (Kelly, 1970) und zusammen mit der Lymphe auch die antigenbeladenen antigenpräsentierenden Zellen (Macatonia, 1987). Die Lymphe strömt durch die lymphatischen Follikel und die paracorticalen Bereiche in den Marksinus und wird dort über ein efferentes lymphatisches Gefäß abgeleitet (Forkert, 1977). Primäre lymphatische Follikel bestehen überwiegend aus B-Zellen (Veerman, 1975). Bilden sich hier durch B-Zellproliferation Keimzentren (*germinal center*, GC), so wird von sekundären lymphatischen Follikeln gesprochen. Die inneren, paracorticalen Bereiche enthalten T-Zellen und dendritischen Zellen (DC). Naive Lymphozyten gelangen über das Blut durch spezialisierte Bereiche der Venolen mit hohem kubischen Endothel, den HEVs (*high endothelial venules*), in den Lymphknoten (siehe Kapitel 1.3.1) und können diese mit der Lymphe über den Ductus thoracicus zur Rezirkulation durch den Körper wieder verlassen.

Innerhalb des Lymphknotens werden zwei Bereiche unterschieden: die B-Zellfollikel und die T-Zellzone. Naive Lymphozyten gelangen unter anderem mit Hilfe des Chemokinrezeptor CCR7 in den T-Zellbereich des Lymphknotens. Hier, wie auch in der PALS-Region (*periarteriolar lymphoid sheath*) der Milz oder dem T-Zellbereich der PP, werden vorrangig die Chemokine CCL21 von den Endothelzellen und CCL19 von den DC und Stromazellen produziert. Da B-Zellen nur sehr geringe Mengen CCR7 exprimieren, sie jedoch auch über

die HEVs in die lymphatischen Organe gelangen, ist ihre Migration nicht nur von CCR7 und dessen Liganden abhängig, sondern wie von Okada et al gezeigt, auch noch von der CXCR4-CXCL12- Interaktion (Okada, 2002).

Der für B-Zellen charakteristische und auch am stärksten exprimierte Chemokinrezeptor ist CXCR5, dessen Ligand CXCL13 (BLC) von folliculär dendritischen Zellen und Stromazellen in den B-Zellfollikel aller sekundären lymphatischen Organen exprimiert wird (Forster, 1996).

Eine Ergänzung des peripheren Immunsystems stellt das mukosale Immunsystem dar. Diese allgemein als MALT (*mucosa-associated lymphoid tissues*) bezeichneten Gewebe befinden sich im Bereich der leicht verletzlichen Schleimhaut-Abschlussgewebe des Körpers und stellen einen der wichtigsten Infektionswege für Pathogene überhaupt dar. Das mukosale Immunsystem ist noch einmal in weitere Kompartimente, BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*) und GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), unterteilt. Dem GALT werden die Gaumen- und Rachenmandeln, der Blinddarm und die Peyerschen Platten zugeordnet.

Die Peyerschen Platten befinden sich entlang des Dünndarms direkt unter dem Darmepithel und ähneln in ihrem Aufbau den Lymphknoten. Sie bestehen aus großen B-Zellfollikeln, welche sich unterhalb spezialisierter Epithelbereiche, dem so genannten „Dom“ befinden. An die B-Zellfollikel grenzen jeweils etwas tiefer liegende T-Zellbereiche. Die Antigen- sowie Pathogenaufnahme in die Peyerschen Platten findet über spezialisierte epitheliale Zellen, den so genannten M-Zellen (*multifenestrated cells*), statt. Naive Lymphozyten gelangen, wie schon bei den Lymphknoten über die HEVs in die PP und verlassen diese über efferente lymphatische Gefäße wieder (Janeway, 2002) (Abb. 1.3).

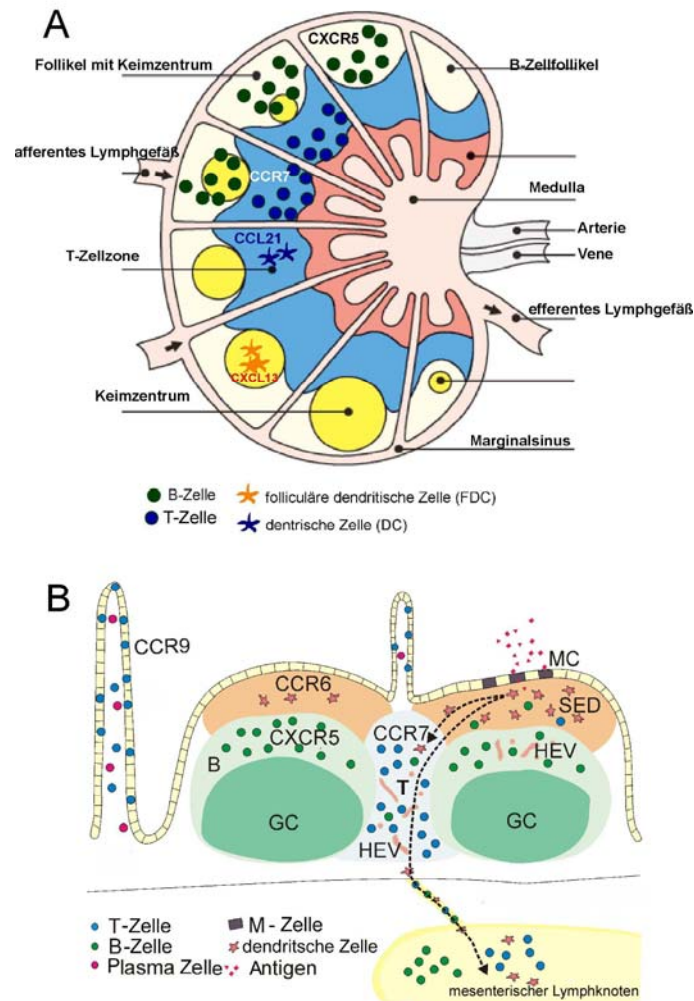


Abb. 1.3 Aufbau eines Lymphknotens und einer Peyerschen Platte

A) Der Lymphknoten besteht aus einem äußeren Cortex (Rinde) und einer inneren Medulla (Mark). Im äußeren Cortex befinden sich die B-Zellfollikel. Die tiefer liegenden oder paracorticalen Bereiche bestehen hauptsächlich aus T-Zellen und dendritischen Zellen. Die Medulla setzt sich aus Strängen von Makrophagen und antikörpersezernierenden Plasmazellen (Markstränge) zusammen. Die Lymphe gelangt über die afferenten Lymphgefäße in die LN und verlässt sie wieder über die efferenten Gefäße in der Medulla. (modifiziert: nach Janeway Immunbiologie)

B) Die Peyerschen Platten bestehen größtenteils aus B-Zellen, welche einen großen Follikel mit Keimzentrum (GC) bilden. Zwischen den Follikeln befindet sich die T-Zellzone. Das Antigen gelangt über die M-Zellen im Epithel in das Gewebe. (modifiziert: nach Ohl et al. Sem.Imm. 2003)

1.5 B-Zellaktivierung durch T-Helferzellen

Damit es im Verlauf einer Immunantwort zu einer hoch affinen Antikörperproduktion der B-Zellen kommen kann, ist es erforderlich, dass sich, aktivierte B- und T-Zellen treffen, welche dasselbe Antigen erkennen. Der Ort, an dem das erste Treffen der beiden Lymphozytenpopulationen stattfindet, ist die Grenze zwischen T- und B-Zellzone in der Milz oder den LN

(Cyster, 1995; Garside, 1998). Diese Interaktion wird durch eine transiente Expression von CCR7 auf den B-Zellen und damit die Migration in Richtung T-Zellzone ermöglicht. Nachdem die B-Zellen über die CD40-CD40Ligand-Interaktion stimuliert wurden, wandert ein Teil in die rote Pulpa der Milz und entwickelt sich zu IgM sezernierenden Plasmazellen. Diese ersten Antikörper weisen jedoch keine hohe Antigenaffinität auf, da sich diese erst im Verlauf des Klassenwechsels durch Hypermutation entwickelt. Ein anderer Teil der B-Zellen, welcher nicht zu Plasmazellen differenziert, wandert weiter in den B-Zellfollikel, proliferiert dort und durch diese verstärkte B-Zellproliferation entwickeln sich hier die Keimzentren (MacLennan, 1994). Die Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5 ist an diesem ersten Kontakt zwischen den B- und T-Zellen von großer Bedeutung. B-Zellen, die kein CCR7 exprimieren, können durch das CCL19-Signal nicht in der T-Zellzone zurückgehalten werden. Dieses führt zu einer verminderten T-Zellhilfe und somit zu einer veränderten primären humoralen Immunantwort (Forster, 1999; Reif, 2002). Exprimieren die B-Zellen hingegen kein CXCR5, gelangen sie nicht in die B-Zellfollikel, und die gesamte Architektur der Milz bzw. des LN kann nicht aufrechterhalten werden (Forster, 1996). Eine Überexpression von CXCR5 auf den B-Zellen führt ebenfalls zu einer Inbalance des Systems (Reif, 2002).

1.6 Die Keimzentrumsreaktion

Nach dem ersten Kontakt antigenspezifischer T- und B-Zellen am Rand des B-Zellfollikels kommt es zu einer verstärkten Proliferation beider Zellpopulationen. Teilpopulationen wandern jetzt entlang des CXCL13-Gradienten in den B-Zellfollikel und akkumulieren in der Nähe der dort anwesenden folliculären dendritischen Zellen (FDC). FDC tragen Antigen-Antikörper- oder Antigen-Komplement-Komplexe auf ihrer Oberfläche und fungieren als Depot für das Antigen, welches für die Aufrechterhaltung der Keimzentrumsreaktion von essentieller Bedeutung ist (Kelsoe, 1996). Die proliferierenden B-Zellen drängen die ruhenden B-Zellen des Follikels nach außen, sodass sich um das Zentrum herum eine Mantelzone aus ruhenden Zellen bildet. Die B-Zellen, welche an der Ausbildung der Keimzentren beteiligt sind, können durch phenotypische Merkmale wie die Bindung von PNA (*peanut agglutinin*) oder die Herunterregulation von Thy-1 von anderen B-Zellen unterschieden werden. Ungefähr 10% der GC-Lymphozyten sind antigenspezifische CD4⁺ Zellen. Ohne die Interaktion der T-Zellen mit den B-Zellen, welche über CD40L-CD40 und CD28-CD86/CD80-Ligation stattfindet, kann sich kaum ein funktionierendes GC entwickeln

(Lane, 1994; Gunn, 1998). Im weiteren Verlauf der Keimzentrumsreaktion bilden sich innerhalb des GC zwei Regionen aus. Erstens: die dunkle Zone (*dark zone*), hier befinden sich die proliferierenden B-Zellen, welche Zentroblasten genannt werden, ferner findet hier die somatische Hypermutation der variablen Regionen statt. Der zweite Bereich wird als helle Zone (*light zone*) bezeichnet, in der sich die FDC, die nicht proliferierenden B-Zellen (Zentrozyten) und die T-Zellen befinden. Hier finden die Affinitätsreifung und der Klassenwechsel der B-Zellen statt. Im Jahr 2004 konnten Allen et al. zeigen, dass auch die Ausdifferenzierung der beiden Keimzentrumszonen durch Chemokine beeinflusst wird. Zentroblasten exprimieren CXCR4 und migrieren somit auf CXCL12, welches verstärkt in der „*dark zone*“ vorkommt. Die Ausbildung der „*light zone*“ hingegen ist abhängig von dem durch FDC produzierten CXCL13 und der CXCR5-Expression auf den Zentrozyten. Die B-Zellen, die diesen Prozess durchlaufen haben, sind entweder zu Plasmazellen, die jetzt hochaffine Antikörper produzieren, oder zu Gedächtnis-B-Zellen geworden (Allen, 2004).

1.7 CXCR5 positive T_{FH}-Zellen

Wie bereits erwähnt, sind T-Zellen an der Aktivierung von B-Zellen als auch an einer Keimzentrumsreaktion beteiligt. Hierfür müssen die Zellen die Fähigkeit haben, in die B-Zellbereiche zu migrieren. Es wird vermutet, dass dies durch die Expression des B-Zellspezifischen Chemokinrezeptors CXCR5 erfolgt.

Die ersten Charakterisierungen einer CXCR5 positiver T-Zell-Subpopulation erfolgte 2000 durch Breitfeld et al. und Schaerli et al. im humanen System. CXCR5 positive CD4⁺ T-Zellen konnten im Blut aber vor allem aus den Tonsillen isoliert werden und wiesen den für humane Gedächtniszellen typischen CD45RO-Phenotyp auf. Während die aus dem Blut isolierten CXCR5 positiven Zellen zusätzlich CCR7 exprimieren, haben die tonsillären T_{FH}-Zellen CCR7 herunterreguliert.

Diese, aus der humanen Tonsille isolierten Zellen weisen neben der CXCR5 Expression eine erhöhte CD40-Ligand und ICOS (*inducible costimulator*) Expression auf (Breitfeld, 2000; Schaerli, 2000). Beide Moleküle haben kostimulatorische Funktionen. So vermittelt eine Bindung von CD40-Ligand an CD40 (auf antigenpräsentierenden Zellen) zusätzliche T-Zellaktivierungssignale, sowie ebenfalls eine Aktivierung der APC. Bei ICOS handelt es sich um ein mit CD28 verwandtes Protein, welches durch die Bindung seines Liganden LICOS eine verstärkte T-Zellantwort induziert (Janeway, 2002).

Bedingt durch ihr Chemokinrezeptorexpressionsprofil $CXCR5^{\text{high}}$, $CCR7^{\text{low}}$ migrieren die T_{FH} -Zellen in die B-Zellbereiche lymphatischen Organe. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass T_{FH} -Zellen im Vergleich zu $CXCR5$ negativen $CD4$ -Zellen sehr effizient die Immunglobulinproduktion (IgM, IgG, IgA) von B-Zellen induzieren können, sich aber andererseits durch eine sehr geringe Zytokinproduktion auszeichnen (Breitfeld, 2000; Schaerli, 2000).

Andere Gruppen konnten zeigen, dass es sich bei den humanen $CXCR5^+$ T_{FH} -Zellen um eine heterogene Population handelt, welche anhand ihrer $CD57$ -Expression weiter unterteilt werden kann (Kim, 2001). Die $CXCR5^+$ $CD57^+$ T-Zellen unterscheiden sich von den $CXCR5^+$ $CD57^-$ Zellen in mehreren Eigenschaften sowie ihrer Lokalisation innerhalb des B-Zellfollikels. $CXCR5^+$ $CD57^+$ Zellen migrieren besser auf $CXCL13$, befinden sich direkt im Keimzentrum des B-Zellfollikels (Tonsille) und scheinen die für die B-Zellhilfe verantwortliche Subpopulation zu sein.

Gene-Array-Analysen der letzten Zeit konnten weitere phenotypische Merkmale der $CXCR5^+$ T_{FH} -Zellen aufdecken. So produzieren $CXCR5^+$ $CD57^+$ Zellen selber $CXCL13$, obwohl sie innerhalb des Keimzentrums von $CXCL13$ produzierenden Zellen umgeben sind (Chtanova, 2004; Kim, 2004). Des Weiteren wurden Marker wie $CD27$, $IL-21$, $IL-6R$ und $CD30L$ gefunden, welche bislang der B-Zellentwicklung oder -funktion zugeordnet wurden (Chtanova, 2004). Das vielfältige Genexpressionsprofil der humanen T_{FH} -Zellen lässt auf weitere Funktionen neben der B-Zellhilfe schließen.

1.7.1 CXCR5-Expression auf T-Zellen der Maus

Im murinen System sind die $CXCR5$ exprimierenden T-Zellen bei weitem nicht so detailliert untersucht wie im Menschen. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass in den Lymphknoten, sowie in der Milz der Maus nur ein minimaler Anteil der $CD4$ positiven T-Zellen $CXCR5$ exprimiert. Auch im Blut lassen sich im Gegensatz zum Menschen kaum $CXCR5^+$ T-Zellen detektieren. Dies spiegelt sich auch in histologischen Aufnahmen dieser Organe wider, wo, verglichen mit der humanen Tonsille, kaum T-Zellen in den B-Zellfollikeln zu finden sind.

Jedoch regulieren murine $CD4^+$ T-Zellen nach einer antigenspezifischen Aktivierung $CXCR5$ herauf (Ansel, 1999). Diese verstärkte $CXCR5$ -Expression geht einher mit einer erhöhten T-Zellanzahl in den B-Zellfollikel nach einer Immunisierung (Garside, 1998; Ansel, 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die $CXCR5$ -Expression auf murinen T-Zellen über $OX40$ reguliert wird. $OX40$ gehört zu den kostimulatorischen Proteinen und wird nach Aktivierung

der T-Zelle exprimiert. Die Bindung von OX40 an OX40-Ligand (OX40L) auf dendritischen Zellen führt zu einer erhöhten CXCR5 mRNA-Produktion (Flynn, 1998), des Weiteren weisen transgene Mäuse für OX40L eine erhöhte Anzahl an T-Zellen in B-Zellfollikeln auf (Brockner, 1999).

1.8 Aufgabenstellung

Der Chemokinrezeptor CXCR5 wird hauptsächlich auf B-Zellen aber auch auf einer Subpopulation von T-Zellen exprimiert. Diese T-Zellsubpopulation wurde beim Menschen in der Tonsille wie auch im Blut beschrieben. Aufgrund der Fähigkeit dieser Zellen B-Zellhilfe zu geben und ihrer Lokalisation innerhalb des B-Zellfollikels werden diese Zellen als T_{FH}-Zellen bezeichnet. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass auch in der Maus durch antigenspezifische Aktivierung eine CXCR5-Expression auf einer Subpopulation von T-Zellen induziert werden kann. Vor diesem Hintergrund sollte mit Hilfe von adoptiven Transferexperimenten mit T-Zellrezeptor transgenen Zellen die CXCR5-Expression auf T-Zellen im murinen System weiter untersucht sowie die CXCR5 exprimierende Population besser charakterisiert werden. Es sollte gezeigt werden, ob die Migration von T-Zellen in die B-Zellbereiche exklusiv mit der Expression von CXCR5 zusammenhängt. Für diesen und weitere Versuche standen CXCR5 defiziente Mäuse mit transgenem T-Zellrezeptor zur Verfügung. Vergleichsexperimente von CXCR5 defizienten Zellen mit wt-Zellen sollten helfen, mögliche Funktionsverluste von T-Zellen ohne CXCR5 aufzuzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Durchflusszytometer: FACS Calibur, LSRII, FACS Aria	<i>Becton & Dickinson, NJ, USA</i>
Fluoreszenzmikroskop	<i>Zeiss Axiovert 200M, Oberkochen</i>
+ Digitalkamera	<i>Hamamatsu ORCA-ER</i>
Kryotom	<i>Leica CM 3050 S, Mannheim</i>
Kühlzentrifuge	<i>Heraeus Multifuge 3 S-R, Hanau</i>
pH-Meßgerät	<i>Mettler Toledo MP225, Gießen</i>
Plastik-Immundefärbekammern	<i>Thermo Shandon, Dreieich</i>
Plastik-Färberacks	<i>Thermo Shandon</i>
Präparationsbesteck	<i>Aesculap / Braun, Melsungen</i>
Thermomixer	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Tischzentrifuge	<i>Heraeus Biofuge pico, Hanau</i>
Untertischzentrifuge	<i>Heraeus Megafuge 1.0, Hanau</i>
ELISA-Washer	<i>Tecan, Crailsheim</i>
ELISA-Reader	<i>Tecan Sunrise, Crailsheim</i>
Strahlenquelle (Cäsium) Gamma Cell 2000	<i>Mølsgaard Medical, DK</i>

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger (Histobond-beschichtet)	<i>Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen</i>
Deckgläser (60 x 24 mm)	<i>Menzel-Gläser / Roth</i>
Membransterilfilter (0,20 µm)	<i>Sartorius Minisart, UK</i>
Mikrotest-Platten U-Boden (96-well)	<i>Roth</i>
Objektträger (zur Vectabond-Beschichtung)	<i>Menzel-Gläser</i>
Plastik-Reaktiongefäße (1,5 ml / 2 ml)	<i>Eppendorf / Roth</i>
Zellkultur-Testplatten(6-well)	<i>TPP, Biochrom, Berlin</i>
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	<i>TPP, Biochrom, Berlin</i>
Immuno Plate MaxiSorb Surface (für ELISA)	<i>NUNC, Roskilde, DK</i>
Spritzen	<i>Braun, Melsungen</i>
Transwellplatten	<i>Corning Incorporated, NY, USA</i>
ELISA Platte Maxisorp	<i>Nunc, Roskilde, DK</i>

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit es nicht anders vermerkt ist, in größtmöglicher Reinheit von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

CFSE	<i>Molecular Probes, Leiden,NL</i>
DAPI	<i>Roche, Mannheim</i>
Mowiol 4-88	<i>Calbiochem, Merck, Schwalbach</i>

2.1.4 Gebrauchsfertige Reagenzien

L-Glutamin-Stammlösung	<i>Gibco (Invitrogen); Eggenstein</i>
Tissue Tek O.C.T. Compound	<i>Sakura Finetek, NL</i>
Penicillin-Streptomycin-Stammlösung	<i>Gibco (Invitrogen), Eggenstein</i>
Tissue Tek O.C.T.Compound	<i>Sakura Finetek, NL</i>

2.1.5 Adjuvantien

Aluminiumhydroxid	<i>HCI Biosector, DK</i>
Cholera Toxin (C-8052)	<i>Sigma</i>
Poly I:C (P-1530)	<i>Sigma</i>

2.1.6 Medien und Seren

Fetal Bovine (Calf) Serum (FCS)	<i>Biochrom, Berlin</i>
Mausserum	<i>Caltag, CA, USA</i>
Rattenserum	<i>Caltag, CA, USA</i>
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	<i>Gibco (Invitrogen), Eggenstein</i>
Ziegenserum	<i>Sigma</i>

2.1.7 Puffer und Lösungen

- CFSE- Stammlösung 5 mM in DMF
- EDTA (0,5 M)
- Erythrozyten-Lyse-Puffer (10 x)

Ammoniumchlorid	8,99 g	(1,7 M)
Kaliumhydrogencarbonat	1,00 g	(0,1 M)
EDTA (Dinatriumsalz)	37 mg	(1,0 mM)
bidest. H ₂ O	auf 100 ml auffüllen	
→ auf pH7,3 einstellen		
- L-Glutamin (100x)

L-Glutamin	200 mM/l
------------	----------
- Penicillin-Streptomycin (100x)

Penicillin G	10.000 U/ml
Streptomycin	10.000 µg/ml
- Tris (für Mowiol)

Tris (0,2 M)	24,2 g
in 800 ml bidest. H ₂ O lösen	
mit konz. Essigsäure (Eisessig) auf pH 8,5 einstellen	
bidest. H ₂ O	1000 ml
- OVA/CT-Injektionslösung
In allen Versuchen, in denen mit OVA/CT immunisiert wurde, wurde folgende Konzentration verwendet: pro Maus: 250µg OVA + 1µg CT in 200µl PBS (100µl pro Flanke)
- Citrat-Lösung (isotonisch, 3,08%)

Natriumcitrat (Dihydrat)	3,08 g (0,4 M)
bidest. H ₂ O	100 ml
- Mowiol

Tris-Stammlösung (pH 8,5)	96 ml 0,2 M
bidest. H ₂ O	48 ml
Mowiol 4-88	33,6 g
auf 50°C erhitzen	

- TBS-T
 10x TBS 121,14 g Trisbase
 90 g NaCl₂
 mit HCl auf pH 7,5 einstellen
 bidest. H₂O 1000ml
 1x TBS-Färbelösung mit 0,05% Tween20
- ELISA-Coating-Puffer 0,1 M NaHCO₃
- ELISA-Blockpuffer PBS mit 10%FCS
- ELISA-Waschpuffer PBS mit 0,05% Tween 20

2.1.8 Antikörper und Konjugate

Direkt-konjugierte monoklonale Antikörper (gegen murine Antigene)

anti-CD3-Cy5 [Klon 17A2]	<i>eigene Produktion</i> ¹⁾
anti-CD4 (L3T4)-Cy5 [Klon RmCD4]	<i>eigene Produktion</i> ¹⁾
anti-CD4 (L3T4)-PerCP [Klon RM4-5]	<i>BD Pharmingen, CA, USA</i>
anti-CD19-Biotin [Klon 1D3]	<i>BD Pharmingen, CA, USA</i>
anti-CD19-FITC [Klon 1D3]	<i>BD Pharmingen, CA, USA</i>
anti-CD45R (B220)-Cy5 [RmB220]	<i>eigene Produktion</i> ¹⁾
anti-CD45R (B220)-PerCP [Klon RA3-6B2]	<i>BD Pharmingen, CA, USA</i>
anti-DO11.10 TCR (KJ1-26)	<i>Caltag, CA, USA</i>
anti-TCR $\nu\alpha$ 2-Biotin	<i>BD Pharmingen, CA, USA</i>
anti-TCR $\nu\beta$ 5.1/5.2 FITC	<i>BD Pharmingen, CA, USA</i>
anti-CD45.1 (Ly5.1) –Biotin	<i>Chemicon, Temecula, USA</i>
anti-CD45.2 (Ly5.1)-FITC	<i>Chemicon Temecula, USA</i>
anti-L-Selektin (CD62L) [Klon MEL-14]	<i>Caltag, CA, USA</i>
anti-ICOS-Biotin	<i>eBioscience, NatuTec, Frankfurt</i>
anti-IFN- γ -PE [Klon XMG1.2]	<i>Caltag, CA, USA</i>
anti-IL-4-APC [Klon 11B11]	<i>BD Pharmingen, CA, USA</i>

¹⁾ freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. Elisabeth Kremmer,
 Forschungszentrum München, Institut für Molekulare Immunologie

Unkonjugierte monoklonale Antikörper (gegen murine Antigene)

Ratte anti-CXCR5 [Hybridom-Überstand 2G8] *eigene Produktion*²⁾

²⁾ (Forster, 1996)

Fusionsproteine

mELC-hIgG1-Fusionsprotein [SH1G6]
(Unsoeld, 2002) *eigene Produktion*

P-Selektin- hIgG1-Fusionsprotein *R&D Systems, Wiesbaden*

Polyklonale Antikörper (gegen IgG-F(ab')₂-Fragment bzw. IgG H+L)

Maus anti-Ratte-Cy3 [212-166-122] *Jackson (Dianova), Hamburg*

Maus anti-Ratte-Cy5 [212-176-102] *Jackson (Dianova), Hamburg*

Ziege anti-human-PE [269-116-088] *Jackson (Dianova), Hamburg*

Streptavidin-Konjugate

Streptavidin-Alexa488 *Molecular Probes, Leiden,NL*

Streptavidin-Cy3 *Jackson (Dianova), Hamburg*

Streptavidin-Cy5 *BD Pharmingen*

Streptavidin-PerCP *BD Pharmingen*

Streptavidin-POX *Jackson (Dianova), Hamburg*

Mauslinien

Balb/c J CrI	<i>Charles River Laboratories</i>
C57Bl/6J CrI	<i>Charles River Laboratories</i>
129SV/Balb/c Ztm(F1 aus 129SV x Balb/c)	<i>eigene Zucht</i>
OT-II (C57Bl/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J (Barnden, 1998)	<i>eigene Zucht</i>
DO11.10 (C.Cg-TgDO11.10)10Dlo/J (Murphy, 1990)	<i>eigene Zucht</i>
<i>Plt/plt</i> (Nakano, 1997)	<i>eigene Zucht</i>
CXCR5 ^{-/-} Ztm(129SV Hintergrund) (Forster, 1996)	<i>eigene Zucht</i>
CXCR5 ^{-/-} Ztm(C57Bl/6 Hintergrund);(F8)	<i>eigene Zucht</i>
CXCR5 ^{-/-} DO11.10 Ztm(129SV Hintergrund x DO11.10)	<i>eigene Zucht</i>
CXCR5 ^{-/-} OT-II Ztm(C57Bl/6 Hintergrund x OT-II)	<i>eigene Zucht</i>
CCR7 ^{-/-} Ztm (Forster, 1999)	<i>eigene Zucht</i>
CCR7 ^{-/-} DO11.10 Ztm(129SV Hintergrund x DO11.10)	<i>eigene Zucht</i>

Anmerkungen zu einzelnen Mauslinien:

DO11.10: Hierbei handelt es sich um einen Mausstamm auf Balb/c Hintergrund dessen CD4⁺ T-Zellen einen transgenen, Ovalbumin (OVA)-spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) exprimieren. Dieser TCR erkennt Ovalbumin im MHC-Klasse-II-(I-A^d)-Kontext.

OT-II: Hierbei handelt es sich um einen Mausstamm auf C57Bl/6 Hintergrund dessen CD4⁺ T-Zellen ebenfalls einen transgenen, Ovalbumin (OVA)-spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) exprimieren. Dieser TCR erkennt Ovalbumin im MHC-Klasse-II-(I-A^b)-Kontext.

Plt/plt: Bei diesem Mausstamm liegt eine spontane rezessive Mutation auf Chromosom4 im Chemokin-Locus vor, welche zu einem Funktionsverlust des CCL19 und des CCL21-Ser führt. CCL21 existiert in zwei Isoformen, von denen CCL21-Ser in lymphoidem Gewebe und CCL21-Leu in nichtlymphoidem Gewebe exprimiert wird.

CXCR5^{-/-}: Hierbei handelt es sich um so genannte „*knock out*“ Mäuse, bei denen mit Hilfe eines Vektors das Exon 2 des CXCR5-Gens unterbrochen wurde und somit kein CXCR5 exprimiert werden kann.

CCR7^{-/-}: Hierbei handelt es sich um so genannte „*knock out*“ Mäuse, bei denen mit Hilfe eines Vektors das Exon 3 des CXCR5-Gens unterbrochen wurde und somit kein CCR7 exprimiert werden kann.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen

Für die Isolation von Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und die herauspräparierten Organe (inguinaler, facialer, mesenterischer Lymphknoten, Peyersche Platten und Milz) mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein kleines Stück Nylongaze gedrückt. Die Gaze wird mit PBS/FCS 3% vorsichtig gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (1200 rpm, 4°C).

Bei der Isolierung von Lymphozyten aus der Milz ist zusätzlich eine hypotone Erythrozyten-Lyse durchgeführt worden.

2.2.2 Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE

5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE bzw. CFSE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher auf Grund seiner lipophilen Beschaffenheit in Zellen diffundieren kann. Dort wird der farb- und fluoreszenzlose Farbstoff durch zelluläre Esterasen gespalten, so dass er in eine stark fluoreszierende und aminoreaktive Form übergeht und an Amine in zellulären Proteinen irreversibel bindet. Bei der Zellteilung wird jeweils die Hälfte des Farbstoffes an die Tochterzellen weitergegeben. Durch die Halbierung der Fluoreszenz lässt sich die Proliferation von Zellen bis zur ca. siebten Generation im Durchflusszytometer verfolgen.

Für die Markierung von Lymphozyten mit CFSE wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und nach Zugabe von 2 µl CFSE-Stammlösung pro 1 ml Zellsuspension für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem CFSE folgten anschließend zwei Waschschrte mit kaltem PBS/FCS.

2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse von Chemokinrezeptoren

Die Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen oder intrazellulärer Proteine erfolgte mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen. Die Färbungen wurden in 96-Vertiefungs-Rundbodenplatten auf Eis durchgeführt. Vor der Färbung von Lymphozyten mit Antikörpern (AK) müssen unspezifische Bindungsstellen mit Rattenserum (RS) bzw. Mausserum (MS) blockiert werden. Hierzu wurde der Zellsuspension 5% des jeweiligen Serums beigefügt und 15min bei RT inkubiert. Die Färbungen mit primären und sekundären Antikörpern erfolgten in je 50µl PBS/FCS für 20-30min auf Eis. Bei der Färbung von CXCR5 zusammen mit anderen Markern ist zu beachten, dass nachdem der α CXCR5mAK mit einem sekundären Maus-anti-Ratte detektiert wurde, jetzt noch eine weiterer Blockierung mit 5% Rattenserum erfolgt. Der Nachweis des CC-Chemokinrezeptors-7 erfolgte durch Färbung mittels Fusionsprotein (Unsoeld, 2002) bestehend aus dem natürlichen Liganden des Rezeptors sowie dem konstanten Teil der schweren Kette des humanen IgG₁. Vor der Inkubation mit o. g. Fusionsproteinen werden die zu untersuchenden Zellen zunächst für 30 min bei 37°C in 50 ml RPMI-Medium / 5% FCS präinkubiert. Die Färbung mit dem Fusionsprotein erfolgt wie eine Färbung mit einem Ak, im ersten Schritt blocken mit Ziegen- oder Rattenserum, dann Inkubation mit dem Fusionsprotein in der entsprechenden Verdünnung und schließlich eine Detektion des humanen Fc-Teils mit einem fluorochrommarkierten Ziege-anti-Human-Antikörper, welcher vorher in der entsprechenden Verdünnung mit 3%MS, 3%RS in PBS/FCS ca.30min präinkubiert wurde.

2.2.4 Färbung intrazellulärer Zytokine

Um intrazelluläre Zytokinproduktion nachweisen zu können, wurden die Zellen nach der Isolation aus den jeweiligen Organen in RPMI mit 10% FCS bei 37°C inkubiert und mit 50ng/ml PMA und 500ng/ml Ionomycin für 2h stimuliert. Dann wurde 10µg/ml Brefeldin A dazugegeben, und die Zellen wurden weitere 2h inkubiert. Die Wirkung von Brefeldin A besteht darin, den vesikulären Transport aus dem Golgi-Apparat an die Zelloberfläche zu hemmen, so dass es zu einer intrazellulären Anreicherung der produzierten Proteine kommt. Jetzt erfolgte eine FACS-Färbung der Oberflächenrezeptoren (siehe 2.2.3), danach wurden die Zellen mit 2% PFA fixiert. Um intrazelluläre Proteine detektieren zu können, mussten die Zellen mit 0,1% Saponin für 30min auf Eis perforiert werden. Die Färbung mit den

Antikörpern IFN-gamma (PE) und IL-4 (APC) erfolgte in PBS mit 0,1% Saponin und ohne FCS.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten

Für die histologischen Analysen wurden die Organe nach der Entnahme in Tissue Tek eingebettet und bei -80°C eingefroren. Das Schneiden der gefrorenen Organe erfolgte an einem Kryotom der Fa. Leica. Wenn nicht anders angegeben, wurden Schnitte von $8\mu\text{m}$ Dicke angefertigt. Diese wurden für eine bessere Anheftung an den Objektträger für ca. 1h bei 37°C getrocknet und dann für 5min in eiskaltem Aceton fixiert.

Die Aceton-fixierten Gefrierschnitte werden zur Rehydrierung für 5 min in TBS-T inkubiert. Anschließend werden die Objektträger auf Plastik-Immundefärbekammern der Firma Thermo Shandon aufgelegt in ein Plastik-Färberack (ebenfalls Thermo Shandon) eingesetzt. Alle Schritte der Antikörper-Färbungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst werden auf jeden Kapillarspalt $150\mu\text{l}$ TBS-T + 5% Serum (MS oder RS) gegeben und die Gefrierschnitte durch 15 min Inkubation geblockt. Die Antikörper werden in ihrer jeweiligen Verdünnung in $120\mu\text{l}$ TBS-T /pro Schnitt aufgetragen und 1h inkubiert. Um eine bessere Übersicht über das jeweilige Gewebe zu bekommen (hauptsächlich für die Färbung von Peyerschen Platten), wird die DNA der Zellkerne hochspezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) angefärbt ($2 \times 150\mu\text{l}$, je 2min). Nach einem abschließenden Waschschrift (zweimal 2 ml TBS-T) zur Beseitigung von Resten der DAPI-Lösung, werden die Immunfluoreszenz-gefärbten Gefrierschnitte in Mowiol eingebettet. Die Auswertung der Immunhistologie erfolgte am Zeiss Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskop (mit Hamamatsu ORCA-ER-Digitalkamera). Detailaufnahmen (in der Regel mit dem 10x- bzw. 20x-Objektiv) werden dabei über die Mikroskop-Steuerungssoftware Axiovision 3.0 ausgeführt, die Ansteuerung des Motortisches und die automatische Zusammenstellung der zahlreichen Einzelbilder (Aufnahme mit dem 10x- oder 20x-Objektiv) zu Übersichtsaufnahmen erfolgt über die Bild-Analyse-Software KS 300 (beide von der Firma Zeiss).

2.2.6 *In vivo* Färbung von CXCR5

Damit die Lokalisation von CXCR5 positiven Zellen innerhalb des Gewebes gezeigt werden konnte, musste eine *in vivo* Färbung mit α CXCR5mAK durchgeführt werden, da der CXCR5-Antikörper (2G8) nicht auf fixierten Cryostatschnitten bindet. Hierzu wurden 250 μ g gereinigter Antikörper i.v. in die Maus gegeben. Nach ca. 2-4h wurden die zu analysierenden Organe entnommen. Die Gewebeschnitte wurden mit Aceton fixiert und wie unter 2.2.5 beschrieben gefärbt.

2.2.7 Zellsortierung

Um aus einem Gemisch von Lymphozyten einzelne Zellpopulationen herauszutrennen, wurde entweder eine Sortierung mittels Markierung der Zellen mit „MACS-Microbeads“ der Firma Miltenyi oder eine Trennung mit Hilfe einer Zellsortierung einzelner fluorochrommarkierter Zellpopulationen durch den FACS-Aria (BD) durchgeführt. Das Prinzip der „MACS“ Zellsortierung beruht auf einer Markierung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern, welche mit einem magnetischen „*Microbead*“ gekoppelt sind. Die Zellen werden nach der Markierung (entsprechend dem Protokoll der Firma Miltenyi) über eine, sich in einem Magnetfeld befindende Säule aufgetrennt.

Bei dem FACS-Aria der Firma BD handelt es sich um ein Durchflusszytometer. Mit dieser Methode können die Zellen nach jedem beliebigen, mit Antikörpern detektierbaren Parameter sortiert werden.

2.2.8 Adoptiver Zelltransfer

Mit Hilfe von adoptivem Zelltransfer kann *in vivo* eine spezifische Zellpopulation verfolgt und untersucht werden. Hierzu können die Zellen entweder durch die Detektion ihres transgenen Rezeptor mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern detektiert werden oder durch eine farbliche Markierung mit z.B. CFSE. Eine weitere Möglichkeit besteht darin kongene Tiere zu verwenden und hierdurch die transferierte Population in dem Empfängertier detektieren zu können. Bei C57Bl/6 Mäusen existieren zwei Isoformen des CD45-Gens, CD45.1 und CD45.2, welche in zwei unterschiedlichen Inzuchtlinien der C57Bl/6 Mäusen exprimiert werden. CD45 wird als „*common leukocyte antigen*“ bezeichnet, welches bedeutet,

dass sich alle Leukozyten der einen Linie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die jeweilige CD45-Isoform von der anderen Linie unterscheiden lassen.

Für die meisten Versuche wurden ein Lymphozytengemisch aus den LN und der Milz von DO11.10 oder OT-II-Mäusen auf 1×10^6 transgene Zellen eingestellt und den Empfängertieren i.v. in die Schwanzvene injiziert. In einigen Experimenten mit CCR7 defizienten DO11.10 Zellen (siehe Kapitel 3.3.3) wurden den Tieren FTY720 (Volker Brinkmann, Novartis) in einer Konzentration von 50µg/ml über das Trinkwasser verabreicht (Henning, 2001).

2.2.9 Adoptiver Transfer von B- und T-Zellen :

Um TNP spezifische B-Zellen zu gewinnen, wurden F1: Balb/c x 129SV Mäuse i.p. mit 100µg TNP-BSA in 200µl Alum immunisiert. In diesen Versuchen diente immer die F1-Generation aus einer Balb/c x 129SV Zucht als Empfängertier, da diese dem genetischen Hintergrund der CXCR5^{-/-} (129SV) DO11.10 (Balb/c) Maus entspricht. 14 Tage später wurden die Milzen entnommen, und die B-Zellen mit Hilfe des MACS-Systems (B220 Microbeads) aufgereinigt. Die *in vivo* Aktivierung der T-Zellen erfolgte über adoptiven Transfer von CXCR5^{-/-} DO11.10 oder CXCR5^{+/+} DO11.10-Zellen (im weiteren Verlauf als DO11.10 bezeichnet) in F1: Balb/c x 129SV-Empfänger, Immunisierung mit OVA und Cholera Toxin (CT) als Adjuvants und Entnahme der Zellen vier Tage nach Immunisierung. Aufreinigung der Zellen über MACS- B220-Depletion und Bestimmung des Anteils transgener Zellen über Färbung mit dem klonotypischen Antikörper KJ1-26 per FACS-Analyse.

Für den *in vivo* B-Zellhilfe-Assay wurden die Empfängertiere (F1: Balb/c x 129SV) sublethal (500rad) bestrahlt. Die bestrahlten Empfänger erhielten dann entweder nur 10^7 gereinigte B-Zellen oder B-Zellen zusammen mit 10^5 aktivierten oder naiven DO11.10 T-Zellen. Einen Tag nach dem Zelltransfer erfolgte eine i.p. Immunisierung der bestrahlten Empfängertiere mit 100µg OVA-TNP in 200µl Alum. Den Tieren wurde 9 Tage nach Immunisierung Blut entnommen und TNP spezifischer Antikörper im Serum per ELISA nachgewiesen.

Für den *in vivo* B-Zellhilfe-Assay wurden 10^6 der aufgereinigten TNP-spezifischen B-Zellen allein oder zusammen mit 10^5 aufgereinigten aktivierten T-Zellen in 96-Vertiefungs-Rundbodenplatten mit 10µg TNP-OVA im Medium kultiviert. Die Analyse TNP-spezifische Antikörper im Zellkulturüberstand erfolgte 10 Tage später per ELISA.

2.2.10 ELISA

Für den TNP-spezifischen ELISA wurden 96-well-Platten (Nunc Maxisorp) mit 5 µg/ml TNP-HSA in Coating-Puffer (60 µl/Vertiefung) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach einmaligem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS/10% FCS (150 µl/Vertiefung) für 2h bei 37°C blockiert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden ebenfalls bei 37°C durchgeführt. Zwischen den Schritten erfolgte ein dreimaliges Waschen der Platten. Das zu untersuchende Serum oder der zu analysierende Zellkulturüberstand wurde für 2h inkubiert und dann mit biotinylierten Antikörpern gegen die entsprechenden Isotypen (IgM, IgG₁, IgG_{2a}) (BD) abgegriffen (1,5h; 60 µl/Vertiefung). Hiernach folgte eine Detektion der Antikörper mit Streptavidin-Peroxidase (Dianova) (45min). Bevor das Entwicklungsreagenz TMB (Sigma) folgte, wurden die Platten sechsmal gewaschen. Die Farbreaktion wurden mit 0,5M H₂SO₄ gestoppt, und die optische Dichte bei 450nm im ELISA-Reader gemessen.

Für die Analyse der ELISA-Daten wurde mit Hilfe der GraphPadPrism-Software eine nichtlineare Regression der erhaltenen Kurven durchgeführt. Durch Verwendung des Emax-Modells wurde der EC₅₀ Wert der Verdünnungskurven bestimmt und diese Werte als „Menge TNP-spezifischer Immunglobuline“ verwendet. Die statistische Analyse „*student's paired t-test*“ erfolgte ebenfalls mit GraphPadPrism. P-Werte kleiner gleich 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

2.2.11 *In-vitro*-Migration (Transwell)

Für die *in-vitro*-Migration von T-Zellen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Chemokines CCL21 wurden Transwell-Einsätze der Fa. Corning (Porengröße: 5 µm, Ø 6,5 mm) verwendet. Die Einsätze müssen am Vortag mit einer Kollagenlösung (Typ IV Kollagen; Konzentration: 20 µg/ml in 0,1N HCl) beschichtet werden: 450 µl der Lösung in die untere Kammer und 50 µl auf den Filter. Die Transwells wurden für eine gleichmäßige Benetzung über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Migration müssen die Transwell-Einsätze noch gründlich mit PBS gewaschen werden. Für den Migrationsassay werden jeweils 500 µl Chemokin-Lösung (CCL21 in Konzentrationen von 100ng bis 1000ng in RPMI-Medium) in die untere Kammer vorgelegt. Als Negativkontrolle dient RPMI-Medium ohne jegliches Chemokin.

Die *in vivo* aktivierten Zellen DO11.10-Zellen wurden vier Tage nach Transfer und Immunisierung mit OVA/CT aus dem drainierenden LN isoliert. Die Zellen wurden vor dem Einsatz in die Transwellkammer mit dem mAK KJ1-26 gegen den OVA-spezifischen TCR

und anti-B220 gefärbt. Pro Kammer wurden 10^6 Zellen in die obere Kammer gegeben, die Migrationszeit betrug 5h bei 37°C .

Nach Ablauf der Migrationszeit wurden aus den unteren Kammer jeweils $100\ \mu\text{l}$ Zellsuspension entnommen und in ein FACS-Röhrchen gegeben zusammen mit $10\ \mu\text{l}$ einer Suspension aus fluoreszierenden Latex-Partikel der Firma Polysciences, Eppenheim ($\varnothing\ 5,895\ \mu\text{m}$; Konzentration: $5 \times 10^5/\text{ml}$). Jedes Analyse-Röhrchen enthält nun die genau definierte Menge von 5000 Partikeln. Es folgte eine Messung am FACS und eine Auswertung mit WinList. Die Anzahl migrierter Zellen kann mit folgender Rechnung bestimmt werden:

$$\text{Migrierte Zellen} = 5 \times \frac{5000 \times Z}{B}$$

mit: Z = Anzahl der gezählten Zellen im gewählten Gate
 B = Anzahl der gezählten Beads im gewählten Gate

2.2.12 Mikroarray-Analyse von T-Zellpopulationen

2.2.12.1 Gewinnung und Aufreinigung der Zellpopulationen

Für die Mikroarray-Analyse wurden folgende Zellpopulationen herangezogen:

1. CXCR5 positive T-Zellen aus Peyerschen Platten. Hierfür wurden die PP von unbehandelten C57Bl/6 isoliert und die Zellen mit $\alpha\text{CD4-PerCp}$, $\alpha\text{CXCR5mAK}$ und Maus-anti-Ratte-Cy5 sowie $\alpha\text{CD19-}$, $\alpha\text{CD8-}$, $\alpha\text{CD11c-FITC}$ gefärbt und dann die $\text{CD4}^+\text{CXCR5}^+$ Population mit Hilfe des FACS-Aria herausortiert.

2. Aktivierte CXCR5 positive Zellen aus dem drainierenden LN. Hierfür wurden Lymphozyten aus OT-II Ly5.1 Mäusen (siehe 2.2.8) i.v. in C57Bl/6 Empfänger transferiert und diese s.c. mit OVA/CT immunisiert. Vier Tage später wurden die drainierenden inguinalen LN präpariert und die Zellen mit αCXCR5 und Maus-anti-Ratte-Cy5, $\alpha\text{CD45.1}$ Biotin und Streptavidin PerCp, $\alpha\text{TCR V}_{\alpha 2}$ PE und $\alpha\text{CD19-}$, $\alpha\text{CD8-}$ sowie $\alpha\text{CD11c-FITC}$ gefärbt und die $\text{CXCR5}^+\text{CD45.1}^+\text{TCRV}_{\alpha 2}^+$ Population herausortiert.

Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach dem Sortieren wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

2.2.12.2 RNA Aufarbeitung und Mikroarray mit dem Agilent (Palo Alto,CA) „Whole Mouse Genome Oligo Mikroarray“ Chip (44k)

Die RNA-Isolation und die gesamte Analyse per Mikroarray wurden von Herrn Dr. U.Wulbrandt (Institut für Immunologie) in Zusammenarbeit mit der Mikroarray-Corefacility der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem „Absolutely RNA Microprep Kit“ von Stratagene gemäß Herstellerprotokoll, wobei zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen eine DNase-Behandlung in die Präparation eingeschlossen wurde. Im Anschluss an die RNA-Isolation erfolgte eine Qualitätsprüfung der RNA am Bioanalyzer (Agilent) mit dem Picochip.

Die Amplifikation der Proben wurde mit dem „Low RNA Input Linear Amp Kit“ der Firma Agilent durchgeführt, und das Markieren mit Cy5/Cy3-CTP erfolgte mit dem Cy5/CTP oder Cy3/CTP der Firma PerkinElmer.

Nach der Farbstoffmarkierung erfolgt eine Aufreinigung der Proben mit dem „Quiagen`RNeasy mini kit“ und eine Konzentrationsbestimmung im Nanodropgerät.

Die Hybridisierung der Proben (750ng) erfolgte mit dem „In situ Hybrisation Kit Plus“ (Agilent) über 17 Stunden bei 60°C im Hybridisierungsöfen Biometra OV5 mit 4rpm in der Agilent Hybridisierungskammer.

Die Messung der Chips erfolgte bei maximaler Auflösung in beiden Kanälen (Cy3=570nm, Cy5=665nm) in dem Affymetrix 428 Scanner mit variabler PMT Spannung (20 bis 70 in fünf Schritten).

2.2.12.3 Auswertung der Mikroarray Daten

Die Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket Imogene5.0. Die berechneten und normalisierten Werte wurden dann in die SAM-Analyse (*sigificance analysis of microarray*) gegeben (Tusher, 2001).

3 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wird die Expression von CXCR5 auf murinen CD4⁺ T-Zellen *in vivo* und die Charakterisierung dieser Zellen anhand von Transfer- und Migrationsexperimenten beschrieben. Des Weiteren befasst sich der erste Teil mit der Beschreibung von CD4⁺ T-Zellen aus CXCR5^{-/-} Mäusen und deren Fähigkeit, B-Zellhilfe zu geben. Ein Teil der hier gezeigten Daten wurde bereits im Mai 2005 veröffentlicht (Hardtke, 2005). Der zweite Abschnitt befasst sich mit dem Vergleich von T-Zellen aus den peripheren Lymphknoten, welche nach antigenspezifischer Stimulation CXCR5 exprimieren und CXCR5 exprimierenden T-Zellen aus den Peyerschen Platten. Hierzu wurden FACS und fluoreszenzmikroskopische Analysen sowie ein vergleichender Gen-Expressions-Array durchgeführt.

3.1 CXCR5-Expression auf aktivierten T-Lymphozyten

Der CXC-Chemokinrezeptor 5 wird auf einer Subpopulation von T-Helferzellen exprimiert, welche aufgrund ihrer Position innerhalb des B-Zellfollikels der humanen Tonsille und ihrer Fähigkeit *in vitro* B-Zellhilfe zu geben, „*follicular B helper T cells*“ genannt wird (Breitfeld, 2000; Schaerli, 2000). Es wurde gezeigt, dass *in vitro* aktivierte T-Zellen schon zu einem frühem Zeitpunkt CXCR5 heraufregulieren, was für eine schnelle Differenzierung in Richtung Effektorzelle spricht (Schaerli, 2001).

Um die Funktion dieser Zellen weiter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von transgenen CD4⁺ T-Zellen aus DO11.10 Mäusen und adoptiven Transferexperimenten die CXCR5-Expression *in vivo* nach antigenspezifischer Aktivierung untersucht.

Der DO11.10-Mausstamm zeichnet sich dadurch aus, dass in diesen Mäusen die CD4⁺ T-Zellen einem transgenen, Ovalbumin (OVA)-spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) tragen, welches von MHC-Klasse-II-Molekülen (I-A^d) präsentiert wird. Dies ermöglicht eine antigenspezifische Aktivierung einer großen Anzahl von Zellen.

Einen Tag vor der Immunisierung wurden Lymphozyten aus den Lymphknoten und der Milz von DO11.10- Mäusen isoliert, CFSE markiert (siehe Material und Methoden 2.2.2) und i.v. in Balb/c Empfängertiere injiziert. Am folgenden Tag erfolgte eine subkutane Immunisierung der Rezipienten mit OVA als Antigen und Cholera Toxin (CT) als Adjuvants.

Die Empfängertiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen Tag null und Tag sechs getötet und die, die Flanke drainierenden Lymphknoten (inguinale LN), sowie nicht drainierende Lymphknoten (faciale LN), Blut und Milz analysiert. Die transferierten OVA-spezifischen Zellen können mit einem monoklonalen Antikörper (mAk) KJ1-26 detektiert werden, der spezifisch den transgenen TCR erkennt. Auf den transferierten Zellen wurden folgende Marker zur Analyse der Zellpopulationen herangezogen: CXCR5 und CCR7 zur Detektion des T_{FH}-Phänotyps, CD62L, um den Aktivierungs- und Migrationsstatus der Zellen festzustellen und P-Selektin-Ligand (P-Sel-L.), um ausdifferenzierte Effektorzellen nachzuweisen.

Abbildung 3.1A zeigt 36 Stunden nach Immunisierung auf den transgenen Zellen eine schnelle Heraufregulation von CXCR5. Zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen noch nicht begonnen zu proliferieren, was mit Hilfe der Fluoreszenzintensität des CFSE in den Zellen, wodurch die Anzahl der Proliferationszyklen gezeigt wird, dargestellt werden kann (Abb. 3.1B).

Der größte prozentuale Anteil an CXCR5⁺ DO11.10-Zellen konnte vier Tage nach Immunisierung detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt sind zwischen 30-40% der transgenen T-Zellen im drainierenden LN CXCR5 positiv. Dieser Prozentsatz reduziert sich ab dem fünften Tag wieder. Im nicht drainierenden LN konnte dieser starke Anstieg an CXCR5 exprimierenden Zellen nicht festgestellt werden (Abb. 3.1C).

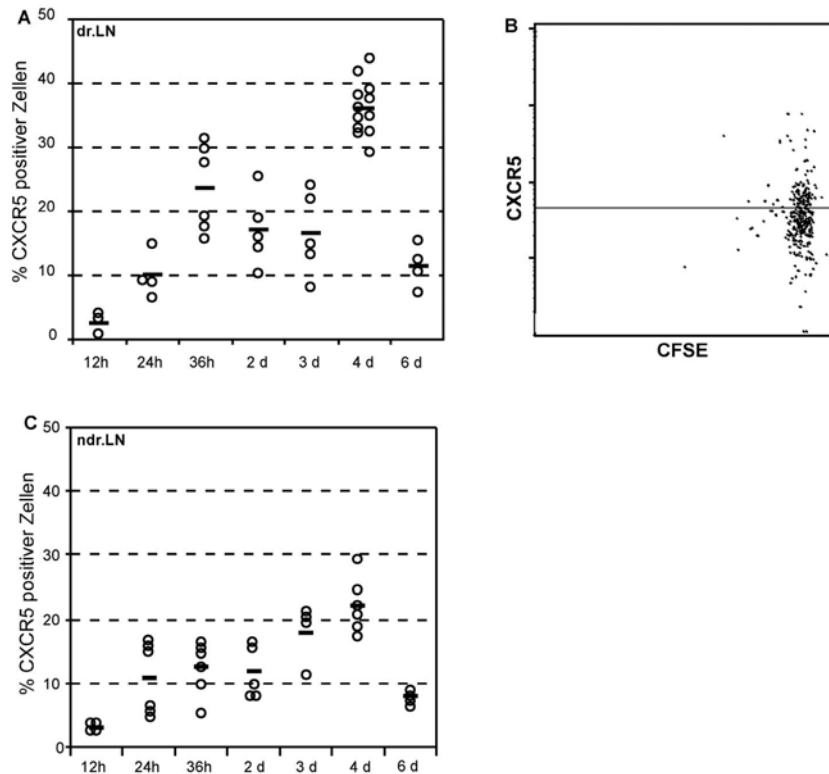


Abb. 3.1 CXCR5-Expression auf adoptiv transferierten DO11.10 T-Zellen

CFSE markierte Lymphozyten aus DO11.10-Mäusen wurden i.v. in Balb/c-Empfänger injiziert und diese einen Tag später mit OVA/CT s.c. immunisiert. Zu den aufgeführten Zeitpunkten wurden Zellen aus den drainierenden (A, B) und nicht drainierenden (C) Lymphknoten per FACS analysiert.

In A und C ist der prozentuale Anteil der CXCR5 exprimierenden KJ1-26⁺ Zellen dargestellt (Kreis, je eine Maus; Strich, Mittelwert); dargestellt sind die Daten aus vier unabhängigen Experimenten.

B) KJ1-26⁺ Zellen aus dem drainierenden LN 36h nach s.c. Immunisierung mit OVA/CT. Die Zellen wurden mit dem α CXCR5-Ak (2G8) und einem sekundären Maus-anti-Ratte-Cy5, sowie KJ1-26 gefärbt.

Da vier Tage nach Immunisierung die CXCR5-Expression auf aktivierten T-Zellen am stärksten ist, wurden die Zellen zu diesem Zeitpunkt phänotypisch weiter analysiert.

Zu diesem Zeitpunkt zeigt eine CXCR5/CFSE-Doppelfärbung der transgenen Zellen im drainierenden LN, dass der größte Anteil der Zellen in den ersten fünf Proliferationszyklen eine intermediäre CXCR5-Expression aufweist und dann nach weiteren Teilungen in eine CXCR5^{high} und eine CXCR5^{low} Population differenziert (Abb. 3.2A). Im Vergleich hierzu zeigt die CCR7/CFSE-Färbung, dass die Oberflächenexpression des Rezeptor innerhalb der hier dargestellten Proliferationszyklen nur sehr geringfügig herunterreguliert wird (Abb. 3.2B).

Hieraus ergibt sich, dass die CXCR5 exprimierende Population auch CCR7 positiv ist und somit nicht den für aus humanen Tonsillen isolierten T_{FH}-Zellen beschriebenen Phänotyp

CXCR5^{high} CCR7^{low} aufweist (Abb. 3.2C). Weitere Analysen der CXCR5⁺ Zellen zeigen, dass sie CD62L positiv und P-Sel.Ligand negativ sind (Abb. 3.2D,E). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass aus einer homogenen T-Zellpopulation vier Tage nach Aktivierung unterschiedliche Subpopulationen differenzieren, welche spezifisch für dasselbe Antigen sind.

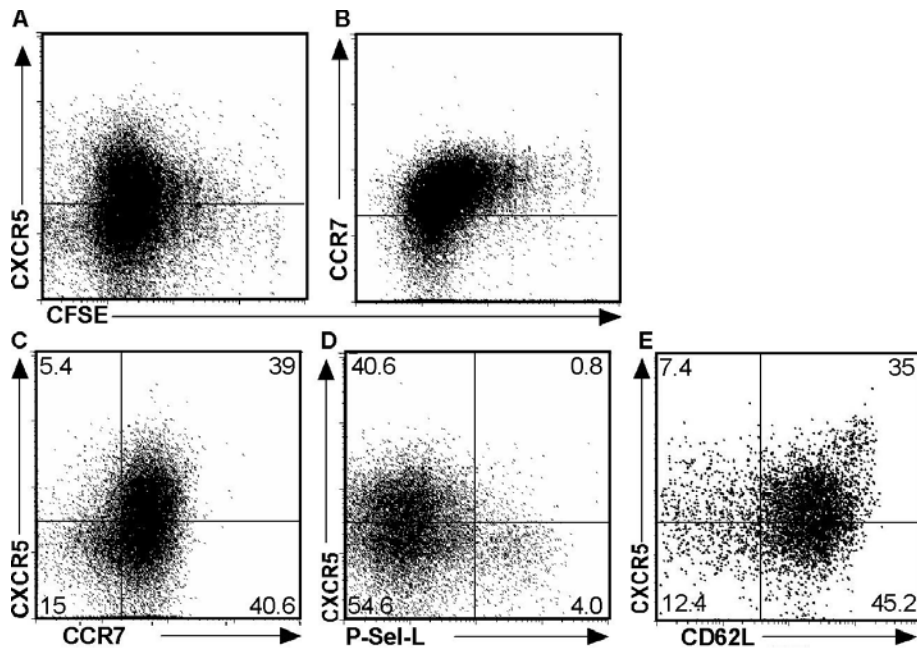


Abb. 3.2 CXCR5, CCR7 und P-Sel.Ligand Expression auf DO11.10 T-Zellen vier Tage nach Aktivierung

CFSE markierte Lymphozyten aus DO11.10-Mäusen wurden i.v. in Balb/c Empfänger injiziert und diese einen Tag später mit OVA/CT s.c. immunisiert. An Tag vier wurden die Zellen aus den drainierenden LN analysiert.

A,B) zeigt die Expression von CXCR5 bzw. CCR7 von KJ1-26⁺ Zellen in Bezug auf die Proliferation (CFSE)

C) CXCR5- und CCR7-Expression bzw. D) CXCR5- und P-Sel.Ligand-Expression der KJ1-26⁺ Zellen vier Tage nach Immunisierung. Weitere Informationen zu den Färbungen in Material und Methoden 2.2.3.

Um einen adjuvantsspezifischen Effekt des Cholera Toxins auf die Chemokinrezeptorexpression auszuschließen, wurde das Experiment mit Poly I:C (*polyinosinic-polycytidylic acid*), einen Adjuvants, welches doppelsträngige RNA und somit eine Virusinfektion imitiert, wiederholt.

Im Gegensatz zu Cholera Toxin ist Poly I:C dafür bekannt, eher eine T_{H1} Immunantwort zu induzieren. Die CFSE-Färbungen zeigen, dass die Zellen auch unter diesem Adjuvants CXCR5 heraufregulieren und der größte Anteil gleichzeitig seine CCR7-Expression beibehält (Abb. 3.3).

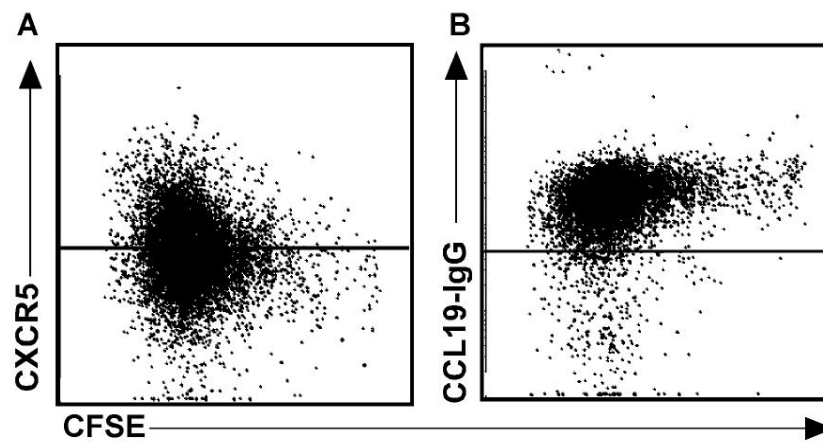


Abb. 3.3 CXCR5 und CCR7-Expression nach Immunisierung mit OVA und Poly I:C

CFSE markierte Lymphozyten aus DO11.10-Mäusen wurden i.v. in Balb/c Empfänger injiziert und diese einen Tag später mit OVA/Poly I:C s.c. immunisiert. An Tag vier wurden die Zellen aus den drainierenden LN analysiert.

A,B) zeigt die Expression von CXCR5 bzw. CCR7 von $KJ1-26^+$ Zellen in Bezug auf die Proliferation (CFSE)

Die Färbungen wurden wie unter Abb. 3.2 beschrieben durchgeführt. Diese Abbildung zeigt Daten aus einer von insgesamt drei Mäusen.

3.2 Lokalisation der transferierten Zellen im Lymphknoten

T-Zellen, die durch Antigenpräsentation aktiviert werden, können in den B-Zellbereich der Milz oder der LN migrieren (Kearney, 1994; Ansel, 1999). Ob die in Abschnitt 3.1 beobachtete CXCR5-Expression auf den transferierten DO11.10-Zellen mit einer Lokalisation im B-Zellfollikel korreliert, sollte in einem adoptiven Transferexperiment mit anschließender immunhistologischer Analyse der drainierenden LN überprüft werden.

In diesem Transferexperiment wurden DO11.10-Zellen aus Balb/c/129SV (CXCR5^{+/+}) oder DO11.10 CXCR5^{-/-} Balb/c (129SV) in die F1-Generation einer Balb/c x 129SV Verpaarung transferiert.

Abbildung 3.4 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (siehe 2.2.5) des drainierenden LN 36 Stunden bis sechs Tage nach OVA/CT Immunisierung. Die transferierten DO11.10-Zellen wurden mit dem TCR-spezifischen Antikörper KJ1-26 (rot) und die B-Zellfollikel mit anti-B220 (blau) detektiert.

Die Migration der transferierten Zellen in die B-Zellfollikel beginnt drei Tage nach der Immunisierung. Diese follikuläre Migration korreliert mit der CXCR5-Expression. An Tag vier konnten die meisten transgenen T-Zellen im Follikel detektiert werden, und ab Tag sechs befinden sich dort nur noch vereinzelte DO11.10 Zellen. Durch Transferexperimente mit DO11.10 CXCR5^{-/-} Zellen konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu wt-Zellen CXCR5 defiziente Zellen auch nach antigenspezifischer Aktivierung nicht in die B-Zellfollikel migrieren (Abb. 3.4B).

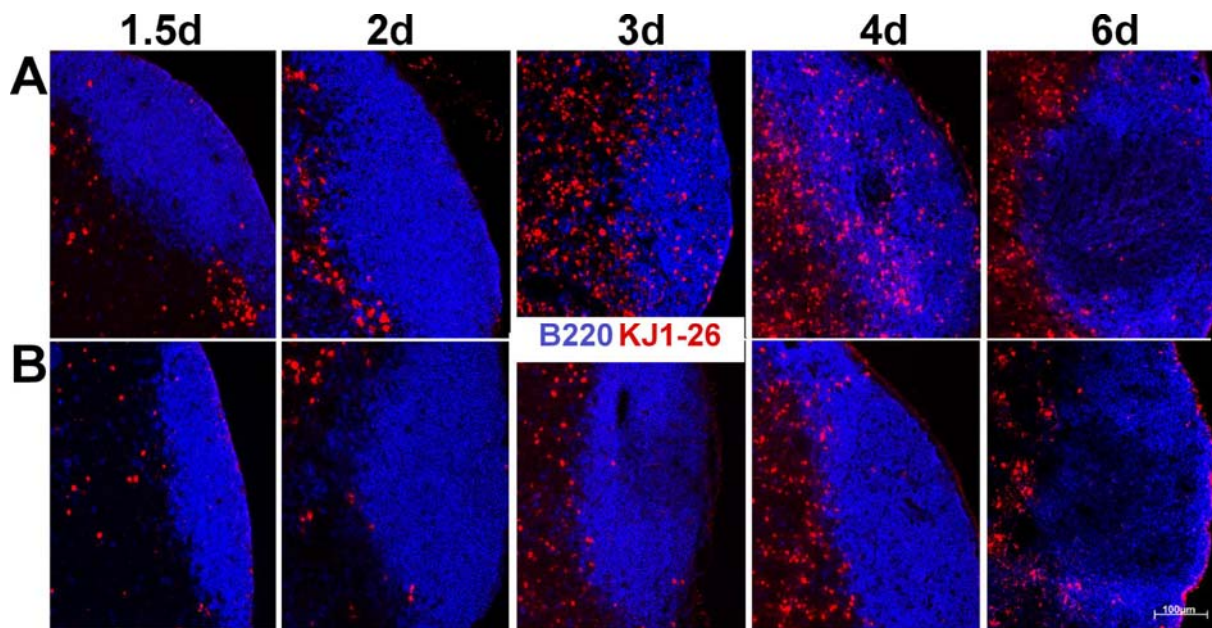


Abb. 3.4 CXCR5^{-/-} können nicht in die B-Zellfollikel migrieren

Immunhistologische Aufnahme von 8µm Gefrierschnitten des drainierender LN. Transfer von Lymphozyten aus A) CXCR5^{+/+} DO11.10 und B) CXCR5^{-/-} DO11.10 (beide auf gemischten Balb/c x 129SV Hintergrund) auf F1; Balb/c x 129SV-Empfängertiere. Die Empfängertiere wurden s.c. mit OVA/CT immunisiert und an den beschriebenen Zeitpunkten die LN entnommen und analysiert. Um die transferierten Zellen und die B-Zellfollikel darzustellen, wurden die Schnitte mit Aceton fixiert und mit KJ1-26 (rot) und anti-B220 (blau) gefärbt. Die Aufnahme erfolgte mit einem 10x Objektiv. Dargestellt sind repräsentative Fotos aus zwei bzw. vier unabhängigen Versuchen, in denen immer zwei Mäuse pro Zeitpunkt analysiert wurden.

3.3 Transferierte CXCR5 positive T-Zellen exprimieren auch CCR7

3.3.1 CXCR5-Expression

Eine Migration von T-Zellen ohne CXCR5 in die B-Zellbereiche der LN und der Milz ist, wie in Abbildung 3.4B gezeigt, nicht möglich. Dennoch scheint die Expression von CXCR5 nicht allein ausschlaggebend für die Migration zu sein, denn obwohl 36 Stunden nach Immunisierung ~20% der Zellen CXCR5 exprimieren (Abb. 3.1), findet zu diesem Zeitpunkt noch keine Migration in die Follikel statt (Abb. 3.4).

Mit Hilfe einer FACS-Analyse wurde die Intensität der CXCR5-Expression auf der Zelloberfläche der transferierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung analysiert.

Wie Abbildung 3.5A zeigt, nimmt die Intensität der CXCR5-Expression auf den KJ1-26⁺ Zellen in der Zeit nach der Aktivierung kontinuierlich zu. Diese Steigerung der CXCR5-Expression spiegelt sich auch *in situ* durch Färbung von CXCR5 auf Schnitten wider (Abb. 3.5B). Da der anti CXCR5-Antikörper (2G8) nicht auf fixierten Gewebeschnitten bindet, musste hier abweichend zu der gängigen immunhistologischen Färbung für den ersten Antikörper eine *in vivo* Färbung eingesetzt werden. Hierzu wurde zwei Stunden vor der Organentnahme den Mäusen gereinigter CXCR5-Antikörper i.v. injiziert, dieser konnte auf den Schnitten mit einem sekundären Maus-anti-Ratte-Antikörper detektiert werden (siehe auch 2.2.6). Abbildung 3.5B zeigt an Tag drei eine sehr schwache CXCR5-Expression (rot) der T-Zellen (grün). Zu erkennen ist dies an den sich überlagernden Rot (CXCR5)- und Grünfluoreszenzen (KJ1-26) und der daraus resultierenden Gelbfärbung der KJ1-26⁺ Zellen. Noch wesentlich deutlicher ist dies an Tag vier, dem Tag mit der höchsten CXCR5-Expression (Abb. 3.1) zu erkennen. Des Weiteren konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass die T-Zellen, welche sich innerhalb des B-Zellfollikels befinden, alle CXCR5 exprimieren.

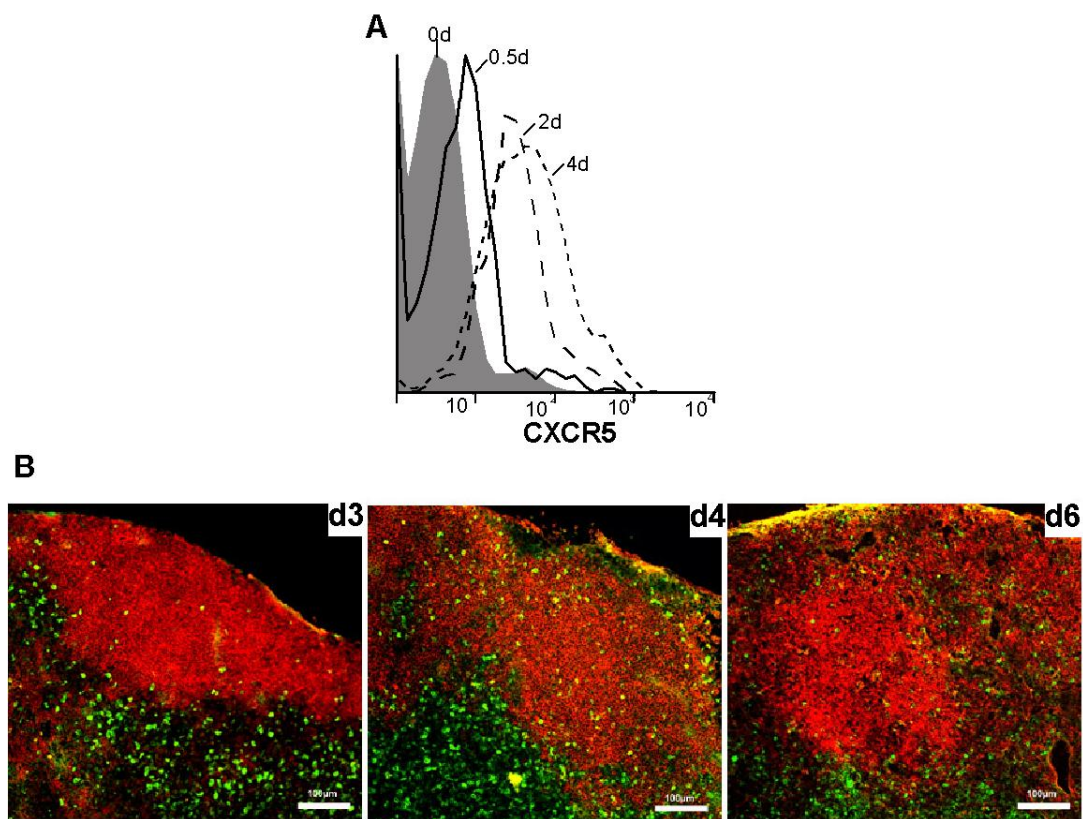


Abb. 3.5 Steigende CXCR5-Expression nach T-Zellaktivierung

A) CXCR5-Expression von naiven DO11.10-Zellen (grau) und adoptiv transferierten DO11.10-Zellen aus dem drainierenden LN. Dargestellt ist die CXCR5-Expression auf KJ1-26 positiven Zellen. Zu jedem Zeitpunkt wurden 2 Tiere analysiert; gleiche Ergebnisse wurden in, je nach Zeitpunkt, einem oder zwei weiteren Experimenten erzielt.

B) Immunhistologische Aufnahme von 8µm-Gefrierschnitten des drainierender LN. Transfer von DO11.10 Zellen und Immunisierung mit OVA/CT. *In vivo* Färbung mit 2G8 (αCXCR5); Detektion mit Maus-α-Ratte-Cy3 (rot), sowie KJ1-26-FITC (grün). Aufnahme mit 10x Objektiv.

3.3.2 *In vitro* Migration von naiven und aktivierten T-Zellen

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente lassen den Schluss zu, dass aktivierte T-Zellen durch die Expression von CXCR5 in die B-Zellfollikel der LN migrieren können, hierfür jedoch ein bestimmter Schwellenwert an CXCR5 auf der Zelloberfläche erreicht werden muss. Die Ursache hierfür könnte in der noch vorhandenen CCR7-Expression begründet sein. Die Zellen werden über CCL21 in der T-Zellzone gehalten, und erst durch ein sehr starkes Migrationssignal via CXCR5 können die Zellen in die B-Zellfollikel migrieren.

Mit Hilfe eines Transwell-Assays, (siehe 2.2.11) wurde überprüft, ob aktivierte DO11.10-Zellen genauso effektiv auf CCL21 migrieren können wie naive. Um aktivierte T-Zellen in den Test einsetzen zu können, wurden erneut Lymphozyten aus DO11.10-Mäusen adoptiv transferiert und die Rezipienten mit OVA/CT immunisiert. Die in den Test eingesetzten Zellen wurden vier Tage nach Immunisierung aus dem drainierenden LN isoliert. Wie Abbildung 3.6 zeigt, ist die Fähigkeit der KJ1-26⁺ Zellen auf CCL21 zu migrieren, vier Tage nach Aktivierung deutlich geringer als bei naiven T-Zellen, obwohl zu diesem Zeitpunkt auch auf den aktivierten Zellen noch CCR7 auf der Oberfläche exprimiert wird (Abb. 3.1). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass T-Zellen im Laufe einer Immunantwort ihre chemotaktische Sensibilität verändern, um ihre Position, ihrer Funktion entsprechend, innerhalb der lymphatischen Organe verändern zu können.

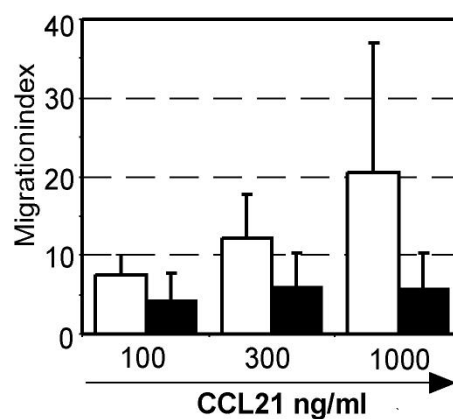


Abb. 3.6 Reduzierte Migration auf CCL21 nach T-Zellaktivierung

DO11.10-Zellen aus dem drainierenden LN von Balb/c Mäusen vier Tage nach adoptiven Transfer und Immunisierung mit OVA/CT (schwarze Balken) oder DO11.10 Zellen aus naiven Spendern (weiße Balken) wurden in einem *in vitro* Transwell-Assay eingesetzt. Dargestellt ist die Fähigkeit der Zellen, auf verschiedene Konzentrationen CCL21 zu migrieren. (Mean + SC; n=3 unabhängige Experimente).

3.3.3 *In vivo* Migration innerhalb lymphatischer Organe

Die Bewegung von Zellen innerhalb eines lymphatischen Organs aufgrund unterschiedlicher Chemokinrezeptorexpression wurde für aktivierte B-Zellen von Reif et al. 2002 mit dem Begriff „*balanced responsiveness*“ beschrieben. Die unter 3.3 beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieses vom „Gleichgewicht“ der Chemokinrezeptorexpression abhängige Migrationsverhalten auch für die CXCR5 exprimierende T-Zellsubpopulation gilt. Um diese Hypothese zu festigen, wurden Transferexperimente mit DO11.10, CXCR5^{-/-} und CCR7^{-/-} transgenen Zellen durchgeführt. Beide „*knock out*“ Linien tragen ebenfalls den OVA-spezifischen TCR, so dass auch in diesen Experimenten eine antigenspezifische Aktivierung mit OVA/CT erfolgen konnte. Da die Migration CCR7-defizienter T-Zellen in die LN gestört ist (Forster, 1999), wurden die Mäuse mit FTY720 behandelt (siehe 2.2.8), was dazu führt, dass eine detektierbare Anzahl CCR7 defizienter, transgener Zellen in die LN migriert (Henning, 2001).

FTY720 ist ein synthetisches Sphingosinanalogen mit immunmodulatorischer Wirkung, welches bei Transplantationen zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion verwendet wird. Die Wirkung auf T-Lymphozyten besteht darin, dass es das Einwandern von Lymphozyten aus dem Blut in die LN und die PP verstärkt (Yanagawa, 1999; Pinschewer, 2000) sowie das Auswandern „*Egress*“ aus den lymphatischen Organen komplett verhindert (Matloubian, 2004).

Die Ergebnisse dieser Transferversuche zeigen, dass sich aktivierte, CCR7 defiziente T-Zellen nicht in der T-Zellzone des LN ansammeln, sondern eine vermehrte Lokalisation der Zellen im Follikel erfolgt (Abb. 3.7C,D). Eine Analyse des Migrationsverhaltens naiver CCR7^{-/-} Zellen nach einem adoptiven Transfer ist nur sehr eingeschränkt möglich, da ohne Immunisierung nur sehr wenige transferierte Zellen in den LN zu finden sind.

Um auszuschließen, dass eine Gabe von FTY720 per se zu einer vermehrten Lokalisation von T-Zellen in den Follikeln führt, wurde auch ein Transfer von wt DO11.10-Zellen unter FTY durchgeführt. Abbildung 3.7A, D zeigt keine vermehrte Migration von KJ1-26⁺ Zellen in die B-Zellbereiche.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Gabe von FTY720, welche zu einer stark erhöhten Anzahl an Zellen in den lymphatischen Organen führt, keine Migration von CXCR5^{-/-} Zellen in die B-Zellfollikel induzieren kann (Abb.3.7B).

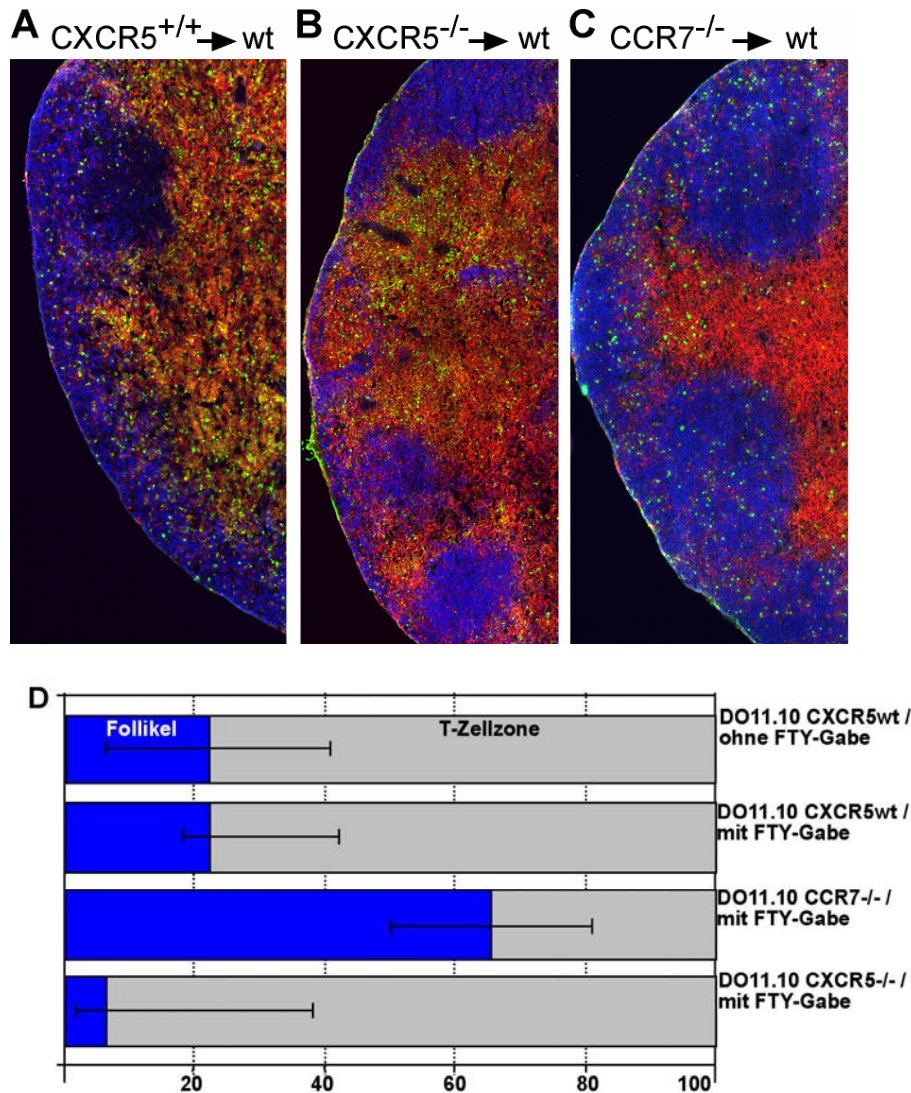


Abb. 3.7 Die Expression von CXCR5 und CCR7 bestimmt die Lokalisation innerhalb des LN

A-C) Immunhistologische Aufnahme von 8µm-Gefrierschnitten drainierender LN. Transfer von Lymphozyten aus A) DO11.10 CXCR5, B) DO11.10 CXCR5^{-/-} und C) CCR7^{-/-} Mäusen (alle auf Balb/c x 129SV gemischten Hintergrund) auf F1 Balb/c x 129SV-Empfängertiere. Alle Empfängertiere erhielten FTY720 durch das Trinkwasser. Die Empfängertiere wurden s.c. mit OVA/CT immunisiert und die LN vier Tage später analysiert. Dargestellt ist eine Färbung der transferierten Zellen mit KJ1-26 in grün, B-Zellfollikel mit anti B220 in blau und T-Zellen mit anti CD3 in rot. Die Daten zeigen jeweils eine Maus von dreien pro Gruppe. Übersichtsaufnahme (20x Objektiv)

D) Mit Hilfe der AxioVision Analyse-Software wurden transferierte Zellen pro µm² gezählt, und der prozentuale Anteil an Zellen im B-Zellfollikel (blau) oder der T-Zellzone (grau) ausgerechnet. Von den jeweils 3 Tieren pro Gruppe wurden mehrere Bereiche aus 2 drainierenden LN pro Tier ausgezählt.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ein weiteres Transferexperiment durchgeführt. CD4⁺ T-Zellen aus OT-II Mäusen mit einem OVA-spezifischen TCR wurden in *plt/plt* Mäuse ((Gunn, 1999), siehe 1.3.1) transferiert und die Empfängertiere einen Tag später mit OVA/CT s.c. in die Flanke immunisiert. Da die *plt/plt* Mäuse auf dem C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet wurden, konnte hier nicht mit dem transgenen DO11.10-System gearbeitet werden. Die T-Zellen der OT-II Mäuse erkennen mit ihrem transgenen TCR dasselbe OVA-Peptid wie die DO11.10 T-Zellen nur in dem für C57Bl/6 spezifischen MHC II (I-A^b). Im Unterschied zu den DO11.10-Zellen gibt es für die OT-II-Zellen keinen klonotypischen Antikörper, so dass diese Zellen anhand der beiden T-Zellrezeptorketten V_{alpha2} und V_{beta5.1} detektiert werden müssen.

Da die *plt/plt* Mäuse aufgrund einer Deletion in 2 von 3 Genloci im SLC-Gen kein CCL19 exprimiert und auch die CCL21-Expression vermindert ist, musste eine Behandlung der Rezipienten mit FTY720 erfolgen, wodurch gewährleistet wurde, dass ausreichend transferierte Zellen die LN erreichen. Der anhand der bislang beschriebenen Ergebnisse ausgearbeiteten Hypothese folgend sollten die transferierten Zellen, ähnlich wie CCR7 defiziente Zellen, nicht in der T-Zellzone zurückgehalten werden können.

Die Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 3.8 demonstrieren, dass die transferierten Zellen, zu erkennen an einer Doppelfärbung (gelb) der beiden T-Zell-Rezeptorketten V_{alpha2} (rot) und V_{beta5.1} (grün), sich in einem *plt/plt* Rezipienten (links) nicht wie bei dem Transfer in eine C57/Bl6 Maus (rechts) überall in der T-Zellzone verteilen, sondern sich in und um die B-Zellfollikel herum befinden.

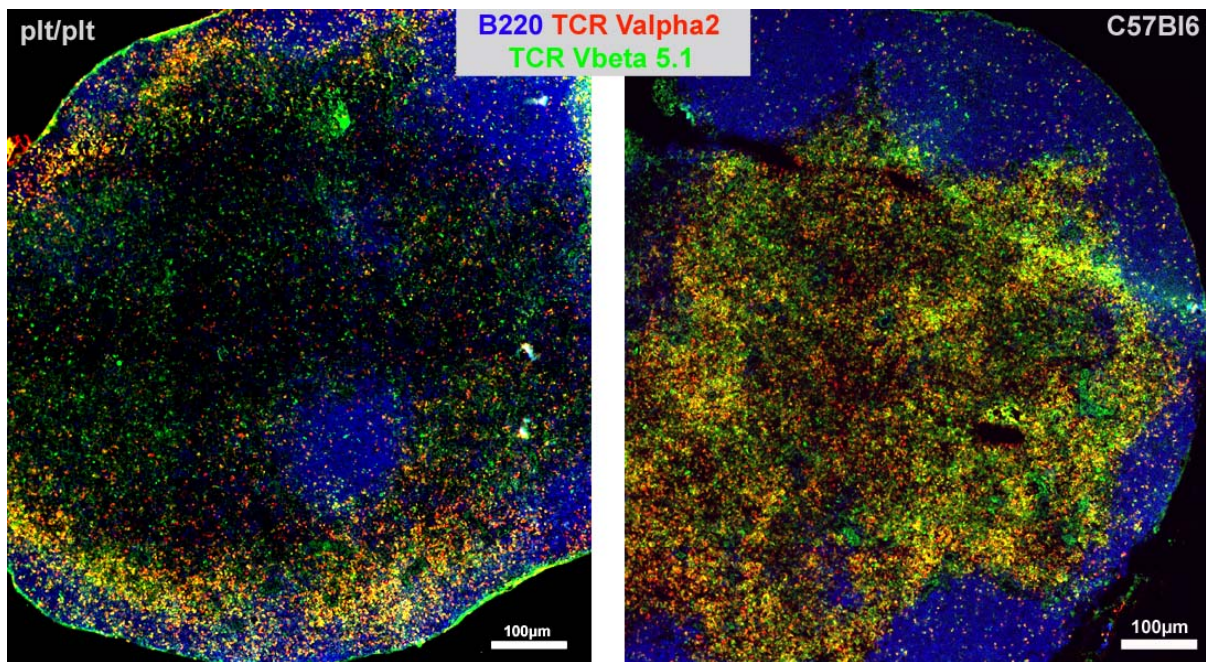


Abb. 3.8 Lokalisation transferierter Zellen in *plt/plt*-Mäusen

Immunhistologische Aufnahme von 8µm-Gefrierschnitten eines drainierenden LN einer *plt/plt* Maus (links) und einer C57Bl/6 Maus (rechts) vier Tage nach Transfer von OT-II-Lymphozyten und OVA/CT-Immunisierung. Die transferrierten Zellen (gelb) sind anhand einer Doppelfärbung anti TCR $V_{\alpha 2}$ (rot) und TCR $V_{\beta 5.1/5.2}$ (grün) zu erkennen. Die B-Zellfollikel wurden mit anti B220 (blau) dargestellt. Die Aufnahme zeigt eine charakteristische Verteilung in einer von fünf Mäusen. Übersichtsaufnahme mit 20x Objektiv.

3.4 *In vivo* B-Zellhilfe durch CXCR5^{-/-} T-Zellen ist stark vermindert

B-Zellen werden durch eine CD40-CD40L-Interaktion den T-Zellen aktiviert. Sie bekommen durch diese Interaktion ein Signal zur Proliferation, Antikörperproduktion oder Immunglobulin-Klassenwechsel (Grewal, 1998).

Die Expression von CXCR5 auf T-Zellen führt, wie gezeigt, zu einer Migration in die B-Zellfollikel, und CXCR5 defiziente Zellen können nicht in die B-Zellfollikel migrieren.

Um die funktionellen Konsequenzen dieser CXCR5-Defizienz auf T-Zellen zu untersuchen, wurde ein adoptiver Transfer von T- und B-Zellen durchgeführt.

Hierfür wurden getrennt voneinander B- und T-Zellen generiert, die spezifisch für dasselbe Antigen sind. Zur Induktion einer antigenspezifischen B-Zellhilfe, wurde ein Hapten-Carrier-System benutzt (siehe Material und Methoden 2.2.9). Die B-Zellen wurden aus Milzen von Mäusen isoliert, welche 14 Tage vorher mit BSA-TNP immunisiert wurden. Bei den aktivierten T-Zellen handelte es sich um adoptiv transferierte Zellen aus drainierenden LN von Mäusen die vier Tage zuvor s.c. mit OVA/CT immunisiert wurden. Die für den Transfer verwendeten T-Zellen stammten aus CXCR5-defizienten DO11.10 Spendertieren (CXCR5^{-/-}) oder DO11.10 Mäusen ohne CXCR5-Defizienz (CXCR5^{+/+}). Mittels einer sublethalen Bestrahlung der Empfängertiere wurde die Anzahl eigener Leukozyten im Blut und in den lymphatischen Organen verringert, so dass ausreichend Platz für die transferierten Zellen geschaffen wurde. Die bestrahlten Empfängertiere wurden einen Tag nach Zelltransfer mit OVA-TNP immunisiert. Durch die Immunisierung mit dem haptensierten OVA konnte erreicht werden, dass die OVA spezifischen T-Zellen, den TNP-spezifischen B-Zellen B-Zellhilfe geben.

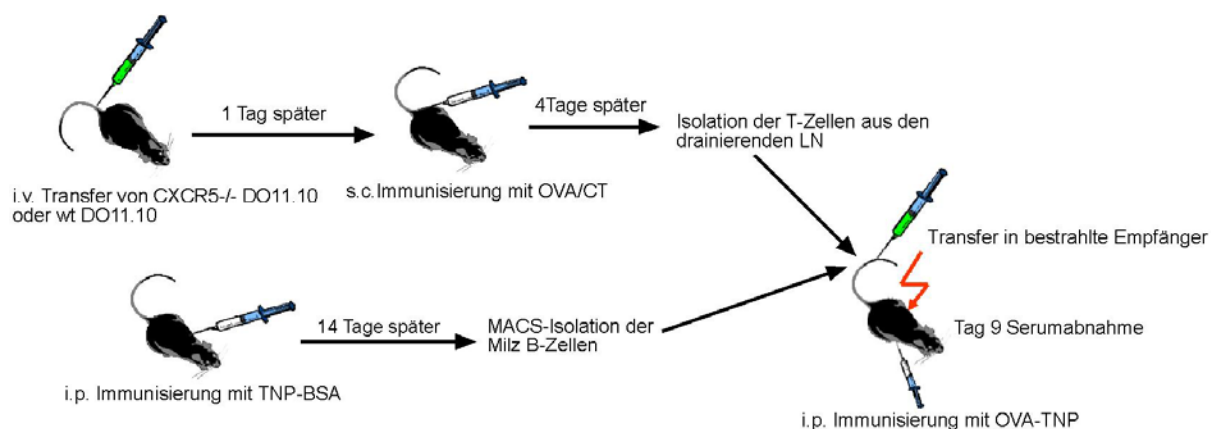


Abb. 3.9 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Von den Mäusen wurden neun Tage nach Immunisierung Blut entnommen und TNP-spezifische Antikörper im ELISA nachgewiesen. Abbildung 3.10A zeigt die Menge an TNP-spezifischem IgG₁. An dieser Stelle wurde nur TNP-spezifisches IgG₁ analysiert, da eine Immunisierung mit Aluminiumhydroxid (Alum) eine T_{H1}-Antwort und somit einen Klassenwechsel zu IgG₁ induziert (Brewer, 1996).

Sowohl die naiven T-Zellen aus wt DO11.10 als auch naive CXCR5^{-/-} DO11.10 T-Zellen waren zu diesem Zeitpunkt nicht in der Lage, eine Immunglobulinproduktion der B-Zellen zu induzieren. Die aktivierten CXCR5^{+/+} T-Zellen induzierten bei den B-Zellen eine Produktion von TNP-spezifischem IgG₁, während die aktivierten T-Zellen aus CXCR5-defizienten Mäusen dazu nicht in der Lage waren (Abb. 3.10A). Um die Abhängigkeit von der CXCR5 gesteuerten Migration zu zeigen, wurde die Fähigkeit der CXCR5 defizienten T-Zellen B-Zellhilfe zu geben noch einmal *in vitro* getestet. Unter den Bedingungen eines *in vitro* Versuches liegen die T-Zellen im Gegensatz zu der *in vivo* Situation dicht mit den B-Zellen zusammen, so dass eine aktive Migration zueinander hier nicht notwendig ist. Abbildung 3.10B zeigt, dass die aktivierten CXCR5^{-/-} Zellen *in vitro* in der Lage waren, bei den präaktivierten B-Zellen eine äquivalente Immunglobulinproduktion zu induzieren wie die CXCR5^{+/+} Zellen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass *in vivo* T-Helferzellen für eine effektive B-Zellhilfe CXCR5 auf ihrer Oberfläche exprimieren müssen, damit der Kontakt dieser beiden Zellpopulationen zustande kommen kann.

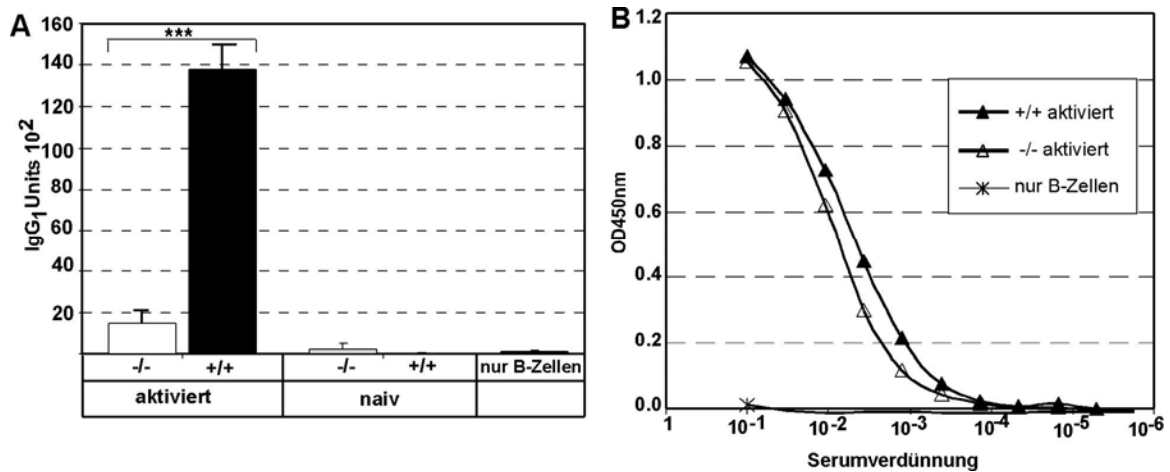


Abb. 3.10 CXCR5^{-/-} T-Zellen zeigen *in vivo* eine verminderte Fähigkeit B-Zellhilfe zu geben

A) TNP-spezifischer Serum-IgG₁ ELISA neun Tage nach Immunisierung. Die sublethal bestrahlten Empfängertiere erhielten präaktivierte B-Zellen alleine (nur B-Zellen) oder zusammen mit naiven bzw. vier Tage *in vivo* aktivierten DO11.10-Zellen von CXCR5^{-/-} (weiße Balken) oder CXCR5^{+/+} (schwarze Balken) Mäusen. Zu sehen ist der Mittelwert mit Standardabweichung (SD) von drei Mäusen pro Gruppe. Übereinstimmende Ergebnisse konnten in zwei weiteren Experimenten erzielt werden. *** p < 0.0001

B) TNP-spezifisches IgG₁ aus dem Kulturüberstand eines zehn Tage *in vitro* Assays. Es wurden die gleichen Zellen wie unter A beschrieben in eine 96-Vertiefungsplatte eingesetzt.

Weitere Details in Abschnitt 3.4 und in Material und Methoden Abschnitt 2.2.10

3.5 CXCR5 defiziente T-Zellen unterscheiden sich bezüglich aktivierungsspezifischer Oberflächen-Moleküle und der Zytokinproduktion nicht von wt-Zellen

Um eine effiziente B-Zellhilfe geben zu können, müssen T-Zellen einerseits durch Migration in Kontakt mit B-Zellen treten können, andererseits müssen sie aber auch selbst aktiviert werden. In folgendem Experiment sollte gezeigt werden, dass sich die transgenen T-Zellen aus DO11.10 CXCR5^{-/-} Mäusen, abgesehen von ihrem Migrationsverhalten, in ihrer Aktivierung oder Effektorfunktion nicht von CXCR5^{+/+} DO11.10-Zellen unterscheiden. Hierzu wurde die Expression kostimulatorischer Moleküle sowie die Zytokinproduktion der Zellen untersucht. Mit Hilfe adoptiver Transferexperimenten von DO11.10- Zellen aus CXCR5^{+/+} und CXCR5^{-/-} Mäusen wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküls ICOS sowie die Expression von IFN- γ und Interleukin-4 auf den transferierten Zellen analysiert.

ICOS gehört zur CD28-Familie und wird nur auf aktivierten T-Helferzellen exprimiert. Die Expression von ICOS kann demnach als Indiz für die Aktivierung einer Zelle herangezogen werden. Abbildung 3.11A zeigt den prozentualen Anteil ICOS exprimierender CD4 positiver KJ1-26⁺ Zellen drei bis sechs Tage nach Transfer und Aktivierung. Sowohl die FACS-Analyse als auch Fluoreszenzaufnahmen (nicht dargestellt) zeigen keinen Unterschied zwischen aktivierten CXCR5^{-/-} (weiße Balken) und CXCR5^{+/+} Zellen (schwarze Balken).

Eine weitere Effektor-Funktion von T-Zellen ist die Fähigkeit nach Aktivierung Zytokine zu produzieren, so führt eine Zytokinproduktion von T-Helferzellen dazu, bei B-Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu induzieren (Janeway, 2002).

Abbildung 3.11B zeigt die IFN- γ und IL-4 Produktion der transferierten Zellen. Es konnte kein Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen CXCR5^{-/-} und wt-Zellen festgestellt werden. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die verminderte Fähigkeit der CXCR5-defizienten T-Zellen, B-Zellhilfe zu geben, allein in der fehlenden CXCR5-Expression begründet ist.

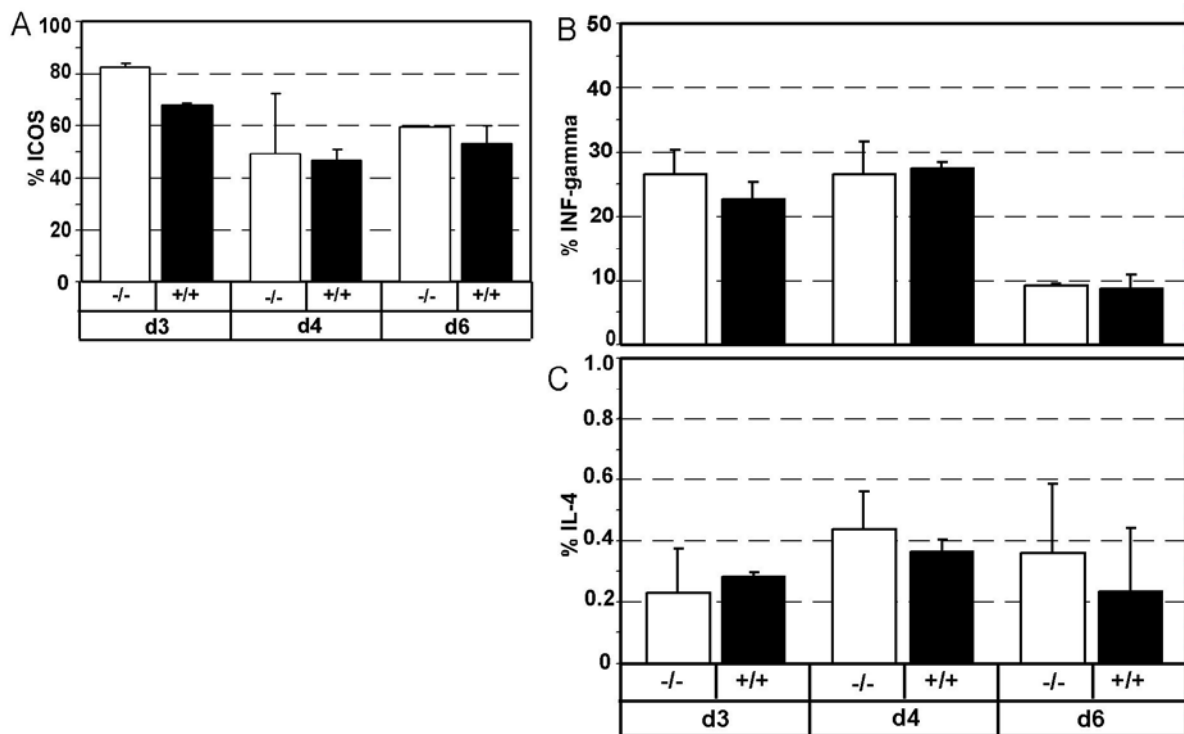


Abb. 3.11 CXCR5^{-/-} T-Zellen produzieren die gleiche Menge an Zytokinen wie wt-Zellen

FACS-Analyse von transferierten CXCR5^{-/-} DO11.10 (weiße Balken) und DO11.10-Zellen (schwarze Balken) aus dem drainierenden LN immunisierter Balb/c x 129SV-Empfänger.

Prozentualer Anteil ICOS exprimierender CD4⁺KJ1-26⁺Zellen

Intrazelluläre Färbung von IFN- γ und IL-4; prozentualer Anteil Zytokin exprimierender CD4⁺KJ1-26⁺Zellen

(Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus zwei Mäusen pro Gruppe; gleiche Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten erzielt)

3.6 B-Zellaktivierung und Klassenwechsel in CXCR5^{-/-} Mäusen

CXCR5 defiziente Mäuse entwickeln keine inguinale, axilläre und brachiale Lymphknoten, die Milzstrukturierung ist nicht ordnungsgemäß ausgebildet, und sie zeigen eine gestörte Keimzentrumsbildung (Forster, 1996). In Abschnitt 3.4 konnte gezeigt werden, dass CXCR5 defiziente T-Zellen auch in einem normal strukturiertem Umfeld (einer CXCR5^{+/+}-Maus) nicht in der Lage sind, eine effiziente B-Zellhilfe zu geben. In folgendem Experiment sollte die T-zellvermittelte B-Zellantwort und somit die Fähigkeit zum Ig-Klassenwechsel in einer CXCR5-defizienten Maus überprüft werden. Hierzu wurden CXCR5^{-/-} Mäuse auf 129SV sowie auf C57Bl/6 Hintergrund mit TNP-BSA in verschiedenen Adjuvantien (CT oder Poly I:C) immunisiert. Durch diese experimentellen Bedingungen sollte sichergestellt werden, dass eventuelle messbare Ergebnisse auf die CXCR5-Defizienz und nicht auf Unterschiede im genetischen Hintergrund der CXCR5-Mutante (129SV oder C57Bl/6) zurückzuführen sind. Die Immunisierung erfolgte entweder intraperitoneal (Abb. 3.12) oder subkutan in die Flanke (Daten nicht gezeigt). Mit einem TNP-spezifischen ELISA wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung TNP-spezifische Immunglobuline im Blutserum nachgewiesen.

Cholera Toxin ist dafür bekannt, eine Immunantwort zu induzieren, welche bei den B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgG₁ veranlasst, während Poly I:C einen Klassenwechsel zu IgG_{2a} induziert (Karagouni, 1990).

In den Abbildungen 3.12A, B ist die Menge an TNP-spezifischen IgG₁ und IgG_{2a} neun Tage nach Immunisierung der Mäuse mit CT und Poly I:C dargestellt. Das Ergebnis zeigt eine signifikant verminderte IgG-Produktion in den CXCR5 defizienten Mäusen (weiße Balken). Im Unterschied dazu zeigen Abbildungen 3.12c, d, dass sich zum selben Zeitpunkt die Menge an IgM im Serum der CXCR5^{-/-} Mäuse (grau) und der wt-Mäuse (schwarz) nicht unterscheidet. Dies deutet auf einen Defekt bei der Induktion des Ig-Klassenwechsels und nicht bei der primären B-Zellaktivierung hin.

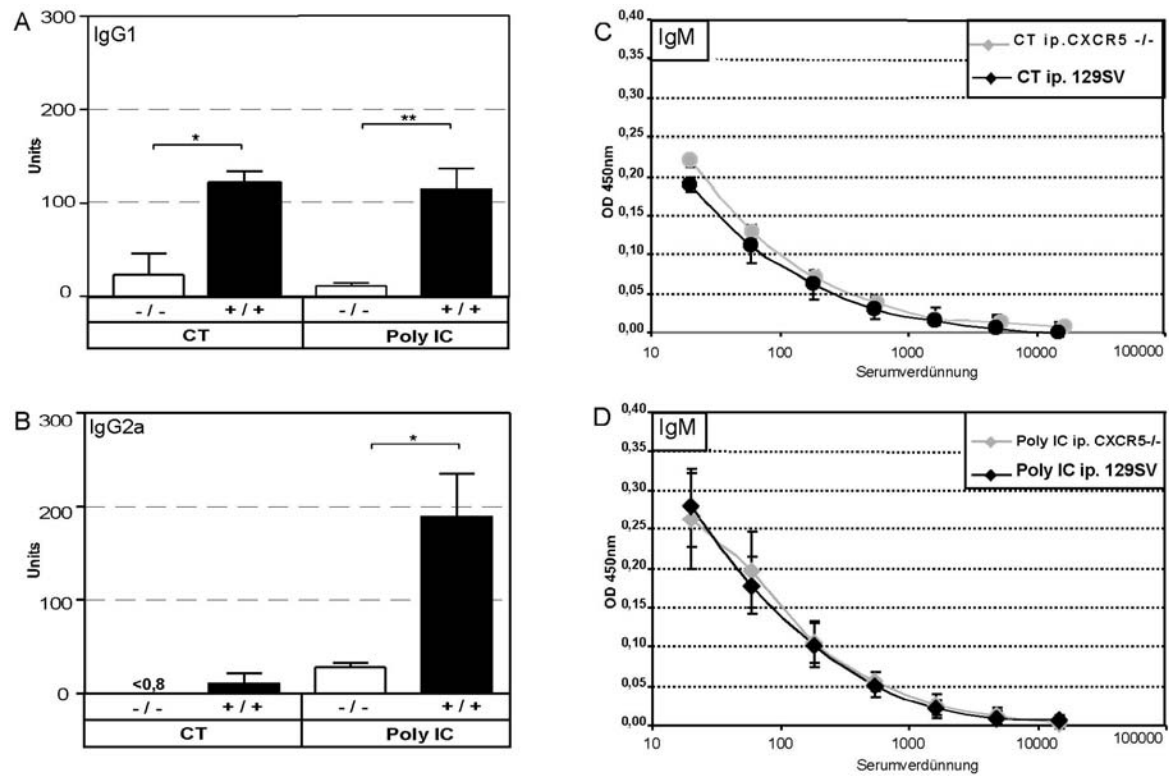


Abb. 3.12 Verminderte IgG Sezernierung CXCR5 defizienten Mäusen

A,B) ELISA-Analyse TNP-spezifischer IgG₁ (A), IgG_{2a} (B) und Immunglobuline im Serum neun Tage nach i.p. Immunisierung. CXCR5^{-/-} 129SV Hintergrund (weiße Balken) und 129SV Mäuse (schwarze Balken) wurden mit TNP-BSA/Poly I:C bzw. CXCR5^{-/-} (C57Bl/6 Hintergrund) und C57Bl/6 mit TNP-BSA/CT immunisiert. (drei Mäuse pro Gruppe; ** p<0.01, * p<0.05; unpaired two tailed student's t-test)

C,D) ELISA-Analyse TNP-spezifischer IgM Immunglobuline im Serum neun Tage nach TNP-BSA/CT s.c. (C) TNP-BSA/ Poly IC i.p. (D) Immunisierung von CXCR5^{-/-} (grau) (129SV Hintergrund) und 129SV wt (schwarz) Mäusen.

3.7 CXCR5 exprimierende T-Zellen in den Peyerschen Platten des Dünndarms

Da bei Mäusen die Tonsillen nicht als definiertes lymphatisches Organ angelegt sind, wurden die Peyerschen Platten als lymphatisches Organ des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes zur Analyse herangezogen. Tonsillen und PP gehören beide zum MALT und weisen auch in ihrer Strukturierung einige Ähnlichkeiten auf. So befinden sich in beiden Organen innerhalb der B-Zellfollikel meistens große Keimzentren, welche in einem LN unter SPF-Haltungsbedingungen nicht zu finden sind, sondern nur in Folge einer Infektion auftreten. Bei der histologischen Analyse von PP wird deutlich, dass sich im Vergleich zu einem peripheren LN, eine erhöhte Anzahl von T-Zellen (rot) innerhalb der B-Zellfollikel (blau) befindet (Abb. 3.13).

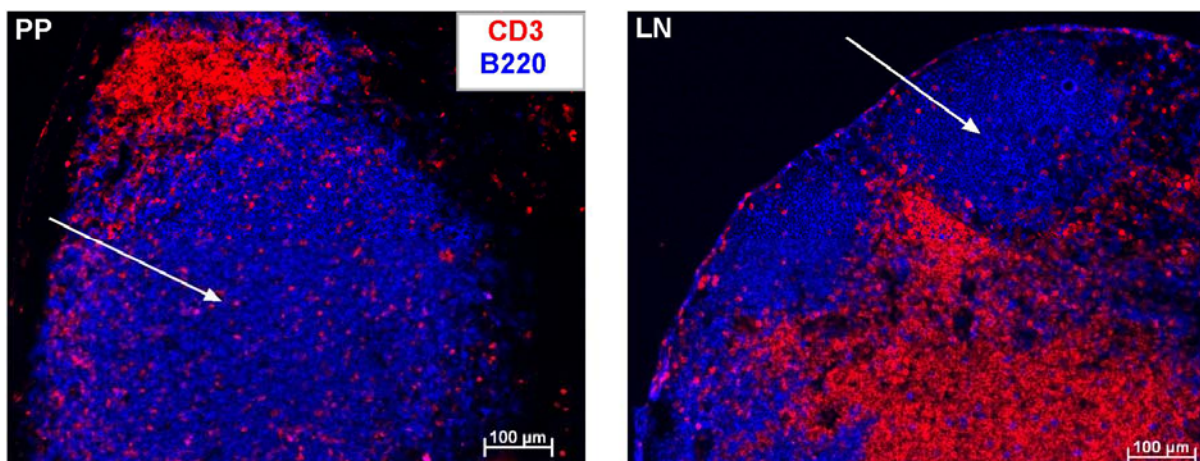


Abb. 3.13 Lage der T-Zellen in PP und LN

Immunhistologische Aufnahmen von 8µm-Gefrierschnitten einer Peyerschen Platte und eines inguinalen LN einer C57Bl/6- Maus. Dargestellt sind T-Zellen mit anti CD3 (rot) und B-Zellen mit anti B220 (blau). Aufnahme mit 10x Objektiv. Diese Aufnahmen sind repräsentativ für C57Bl/6 sowie Balb/c-Mäuse.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Anteil an CXCR5 exprimierenden T-Zellen in PP von C57Bl/6 und Balb/c-Mäusen untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass in den PP zwischen 40-50% aller CD4 positiven T-Zellen auch CXCR5 positiv sind. Eine Doppelfärbung der beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 auf den Zellen zeigt, dass die CXCR5 positiven T-Zellen aus den PP CCR7^{low} sind, während die CXCR5 exprimierenden Zellen aus den LN doppelt positiv sind (Abb. 3.14).

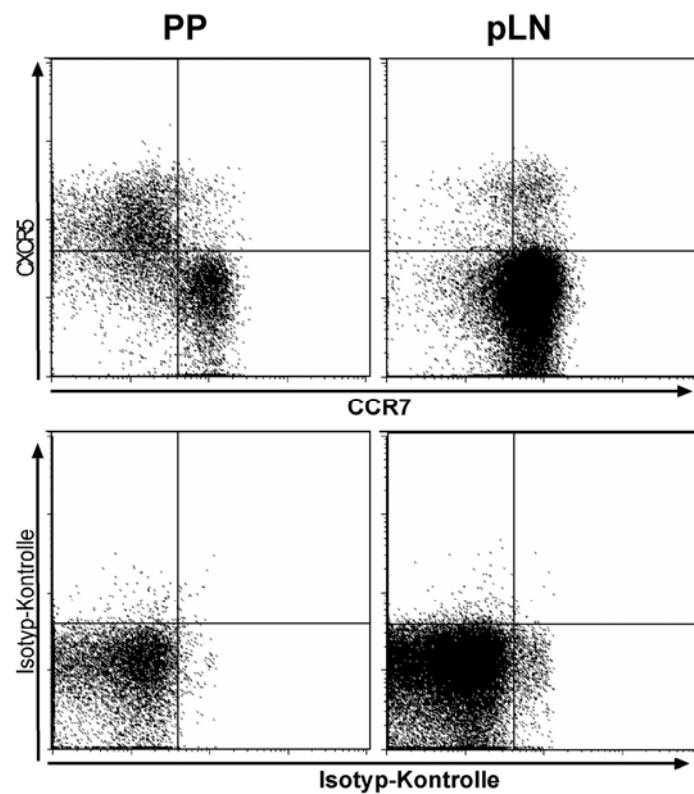
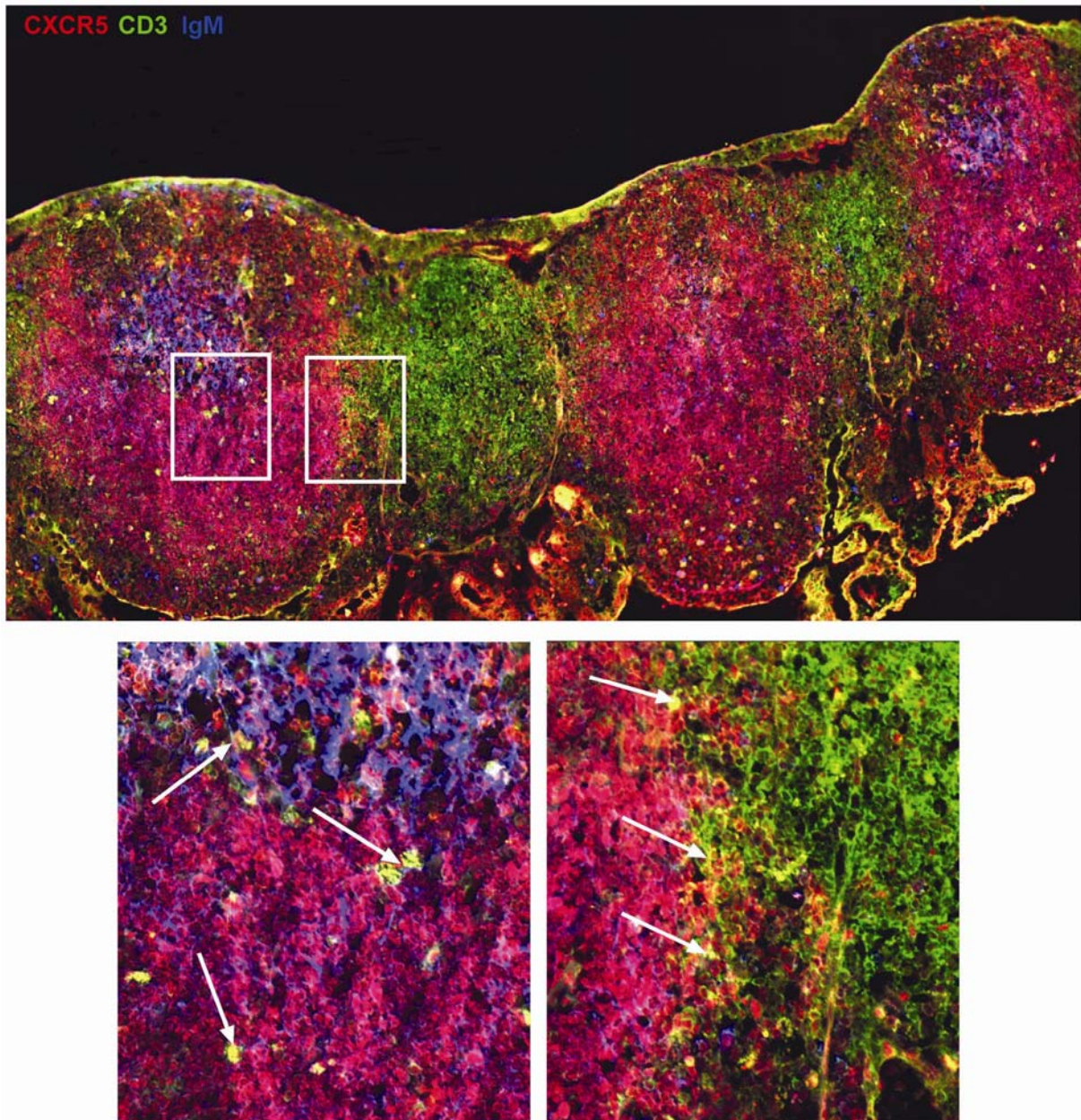


Abb. 3.14 CCR7 und CXCR5-Expression auf CD4⁺ T-Zellen in PP und LN

Lymphozyten aus PP und pLN von unbehandelten C57Bl/6 wurden mit anti CD4-PerCp und entweder mit anti CXCR5 (2G8) und Maus-anti-Ratte-Cy5, sowie dem CCL19-Ig Fusionsprotein gefolgt von Ziege-anti-human-PE oder den entsprechenden Isotyp-Kontrollen gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist die CXCR5- und CCR7-Expression der CD4 positiven Zellen.

Die Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 3.13) und die FACS Analyse (Abb. 3.14) der Peyerschen Platten zeigen, dass auch hier die beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 und ihre Expression auf T-Zellen deren Lokalisation innerhalb des lymphatischen Organs beeinflussen. Mit Hilfe einer *in vivo* CXCR5 Färbung (siehe 2.2.6 und 3.3.1) sollte analysiert werden, an welcher Stelle innerhalb der PP sich die CXCR5 exprimierenden T-Zellen befinden. Wie schon in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, wurde diese *in vivo* Färbetechnik für CXCR5 entwickelt, da der primäre Ak nicht auf Gewebeschnitten färbt. Somit war es zum ersten Mal möglich die Färbung CXCR5 positiver Zellen innerhalb muriner Peyerschen Platten zu zeigen. Abbildung 3.15 zeigt eine Übersichtsaufnahme einer PP mit zwei vergrößerten Ausschnitten.

Die CXCR5 (rot) exprimierenden T-Zellen (grün), zu erkennen an der Mischfarbe Gelb, befinden sich eindeutig innerhalb der B-Zellfollikel sowie direkt am Übergang zwischen B- und T-Zellzone.

**Abb. 3.15 CXCR5 in vivo Färbung in PP**

Immunhistologische Aufnahme von 8 μ m- Gefrierschnitten einer Peyerschen Platte. *In vivo* Färbung mit 2G8 (α CXCR5); Detektion mit Maus- α -Ratte-Cy3 (rot), sowie α CD3 (grün) und α B220 (blau). Die untere Zeile zeigt Vergrößerungen der beiden eingezeichneten Ausschnitte. Übersichtsaufnahme mit 20x Objektiv.

3.7.1 T_{FH}-phänotypische Marker auf CXCR5 positiven T-Zellen aus PP

Die Peyerschen Platten der Maus ähneln, wie unter 3.7 beschrieben, in Bezug auf Lokalisation und CXCR5-Expression der T-Zellen den Tonsillen eines Menschen. Beide Organe gehören zum mukosalen Immunsystem und bieten den dort vorhandenen oder durch sie hindurch zirkulierenden Zellen ein anderes Milieu als ein peripherer Lymphknoten. Durch den ständigen Kontakt mit Nahrungsmittelantigenen und Kommensalen ist eine große Anzahl an Zellen ständig aktiviert. Welche Bedeutung das in einer PP vorliegende Milieu für die Ausbildung von T-Zellsubpopulationen hat, sollte mit Hilfe von FACS-Analysen der CXCR5 exprimierenden T-Zellen bezüglich anderer, für aktivierte T-Zellen, und im speziellen für T_{FH}-Zellen typischer Marker wie ICOS, CD40L und OX40 analysiert werden. Es zeigte sich, dass ein wesentlich größerer Anteil CXCR5 positiven T-Zellen, verglichen mit CXCR5 negativen Zellen, die beiden kostimulatorischen Moleküle ICOS und OX40 exprimiert (Abb. 3.16A). Des Weiteren zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PP, dass die ICOS (Abb. 3.16B, obere Reihe) als auch die CD40L (Abb. 3.16B, untere Reihe) exprimierenden Zellen vor allem im Keimzentrum der Peyerschen Platten zu finden sind (Abb. 3.16B). Dies deutet darauf hin, dass die hier analysierten CXCR5 positiven T-Zellen aus den PP der Maus folliculäre T-Helferzellen sind.

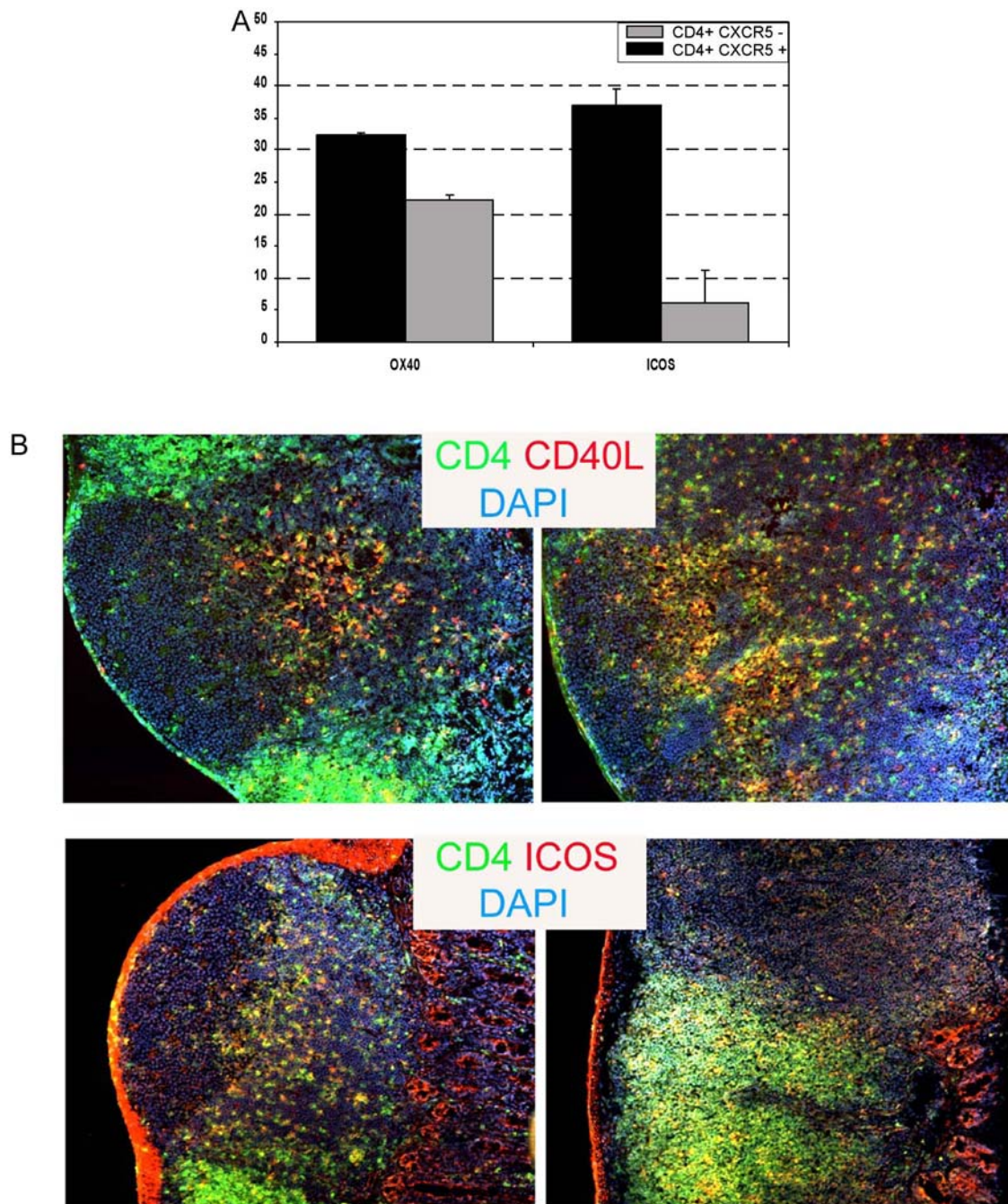


Abb. 3.16 CXCR5⁺ Zellen aus PP exprimieren ICOS, OX40 und CD40L

A) Lymphozyten aus den PP von C57Bl/6 Mäusen wurden mit α CXCR5 (2G8) und Maus-anti-Ratte-Cy5 sowie α CD4, α OX40 und α ICOS gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der OX40 bzw. ICOS exprimierenden der CXCR5 positiven (schwarze Balken) oder CXCR5 negativen (graue Balken) CD4 positiven T-Zellen.

B) Immunhistologische Aufnahme von 8 μ m- Gefrierschnitten von Peyerschen Platten von C57Bl/6 Mäusen. Die Schnitte wurden mit α CD4-FITC (grün) und entweder α ICOS-Biotin und Streptavidin-Cy3 (obere Reihe; rot) oder α CD40L-unmarkiert und einem Ziege-anti-hamster-Cy5 (untere Reihe; rot) sowie DAPI (blau) gefärbt.

3.8 Vergleich von CXCR5 exprimierenden Zellen aus LN und PP mittels Mikroarray

Die unter 3.1 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass transferierte T-Zellen nach Aktivierung CXCR5 heraufregulieren und drei Tage nach Aktivierung anfangen in den B-Zellbereich des LN zu migrieren. Die Expression von CXCR5 auf murinen CD4 positiven T-Zellen in den LN oder der Milz steht in einem direkten Zusammenhang mit dem Aktivierungsstatus der Zellen. In einem peripheren LN einer unter SPF-Bedingungen gehaltenen Maus finden sich so gut wie keine aktivierte Zellen und somit auch nur ein sehr geringer Anteil CXCR5 exprimierender T-Zellen. Hingegen konnte, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben, in den Peyerschen Platten der Maus eine größere Anzahl CXCR5 positiver T-Zellen identifiziert werden, welche in den B-Zellfollikeln oder am Rand zwischen B- und T-Zellzone zu finden sind (Abb. 3.15). Da es sich bei den CXCR5 positiven T-Zellen aus den PP aufgrund des dort vorherrschenden Milieus (siehe Abschnitt 3.7.1) ebenfalls um aktivierte T-Zellen handelt, sie sich jedoch in ihrer CCR7-Expression von den CXCR5 positiven aus den LN unterscheiden, sollte mit Hilfe eines DNA-Mikroarrays ein Vergleich der beiden Populationen durchgeführt werden. Diese Analyse sollte helfen, den Phänotyp und vielleicht die Funktion einer murinen CXCR5 exprimierenden T-Zelle genauer zu beschreiben.

Mit Hilfe eines DNA-Mikroarrays kann die Genexpression von Zellen verglichen werden. Somit können sämtliche in der Zelle exprimierte Gene und noch nicht weiter bekannten ESTs (*Expressed Sequence Tags*) zu der Charakterisierung einer Zellpopulation herangezogen werden. Hierzu wird die RNA der zu analysierenden Zellen isoliert und in Form von zytochrommarkierten cDNA-Sonden auf den jeweiligen Chip hybridisiert. Der in dieser Arbeit verwendete „*Whole mouse genome oligo microarray*“ der Firma Agilent Technologies umfasst 41000 Maus-Gene und Transkripte.

Folgende Zellpopulationen wurden in die Analyse einbezogen: 1. CXCR5 positive CD4⁺ T-Zellen aus den PP von unbehandelten C57Bl/6 Mäusen. 2. aktivierte CXCR5⁺ OT-II-Zellen aus dem drainierenden LN (detaillierte Beschreibung der Zellisolation unter 2.2.11.1). Der hier beschriebene Gene-Array und die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. U. Wulbrandt aus dem Institut für Immunologie in der „Core Facility“ für Arrays der Medizinischen Hochschule Hannover (siehe 2.2.12).

Um aussagekräftige Daten mit dem Gene-Array zu erhalten, wurde der gesamte Versuch zweimal durchgeführt. Im Detail wurden im ersten Array für die RNA-Präparation Zellen aus 15 Mäusen pro Gruppe in drei Durchgängen sortiert und dann gepoolt. Da immer zwei mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte Sonden auf einen Chip hybridisiert wurden und

sich diese Fluorochrome in ihrer Intensität unterschieden, erfolgte eine Kreuzhybridisierung der markierten Sonden um fluorochrom-bedingte Unterschiede in der Signalstärke auszuschließen. Im zweiten Array wurden noch einmal Zellen aus 10 bzw. 15 Mäusen je Gruppe sortiert und wiederum gepoolt. Für die Analyse der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene in CXCR5 positiven Zellen aus PP oder dem drainierenden LN wurden die Daten aus beiden Arrays, nach Abzug des Hintergrundes wie unter 2.2.12.3 beschrieben, normalisiert und mittels SAM (Tusher, 2001) analysiert.

Der Vergleich der beiden CXCR5⁺ Zellpopulationen mittels DNA-Mikroarray ergab, dass insgesamt 371 Gene unterschiedlich reguliert sind. Davon sind 196 in den OT-II CXCR5⁺ Zellen signifikant erhöht und 175 in den CXCR5⁺ Zellen aus den Peyerschen Platten. Die gesamten Listen der regulierten Gene befinden sich im Anhang (Tabelle 1 und Tabelle 2). Sehr viele der dort aufgelisteten Gene konnten noch nicht in einen direkten Zusammenhang mit den beiden T-Zellpopulationen gebracht werden, da es sich um nicht weiter determinierte ESTs oder um in der Literatur nicht für T-Zellen beschriebene Gene handelt. In Tabelle 3.1 sind einige ausgewählte Gene dargestellt, die in der CXCR5⁺ Population aus den PP signifikant erhöht sind im Vergleich mit den aktivierten CXCR5⁺ OT-II-Zellen aus den LN.

Einordnung nach Funktion/Zelltyp	Name des Gens	CD Nummer	Acessionnummer	Score (d)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
Interleukin Rezeptoren	Il1r2	CDw121b	NM_010555	1,82	8,09
	Il7r	CD127	NM_008372	1,06	4,75
	Il18r1		NM_008365	1,24	2,98
Interleukin	Il22		NM_016971	1,95	8,20
Integrin	Itga4 (Integrin alpha4)	CD49D	NM_010576	1,59	4,27
Ras Signaling Pathway	Plid1		NM_008875	0,96	2,67
Suppressor; Zytokinsignaling SOCS	Asb2		NM_023049	1,46	8,82
CD45RA- CCR7- Effektorgedächtnis Zellen ?	NT5e	CD73	NM_011851	1,45	9,71
	KLRB1	CD161	NM_010737	0,85	2,16
CD45RO+ Gedächtnis-Zellen ?	Idb4 (core2 O-Glykan)	CD43	NM_031166	0,88	3,39

TABELLE 3.1 SIGNIFIKANT ERHÖHTE GENE AUF CXCR5 POSITIVEN T-ZELLEN AUS PP

In Tabelle 3.2 sind einige ausgewählte Gene aufgelistet, die in der CXCR5⁺ Population aus den PP als signifikant geringer exprimiert gefunden wurden. Diese Gene sind demnach in den CXCR5⁺ OT-II Zellen erhöht exprimiert.

Einordnung nach Funktion/Zelltyp	Name des Gens	CD Nummer	Acessionnummer	Score (d)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
Integrine	Itgb1		NM_010578	0,51	12,79
	Itgb4bp		NM_010579	1,02	2,30
L-Selektin	Sell	CD62L	NM_011346	0,55	4,28
Chemokinrezeptor	CCR7		NM_007719	1,10	2,04
Fas-signaling Pathway (CD95)	Casp3		NM_009810	1,07	2,15
	Cflar		NM_207653	0,76	2,68
Interleukin Rezeptoren	Il17rb	CDw217b	NM_019583	0,55	4,09
	Il10ra	CDw210a	NM_008348	0,98	2,58
GPI-anchored molecule	Ly6c		NM_010741	0,67	3,82
	Ly6a (SCA-1)		NM_010738	0,66	3,94
Regulatorische T-Zellen	Nrp1 (Neuropilin)		NM_008737	0,67	4,56

TABELLE 3.2 SIGNIFIKANT ERHÖHTE GENE AUF TRANSFERIERTEN, AKTIVIERTEN OT-II CXCR5 POSITIVEN T-ZELLEN DES DRAINIERENDEN LN

Wie schon mit den vorangegangenen FACS Analysen gezeigt werden konnte, exprimieren die CXCR5 positiven transgenen Zellen nach Aktivierung immer noch CCR7 und L-Selektin (Abb3.2). Dieses Ergebnis konnte mit dem Gene-Array bestätigt werden. Ansonsten konnten auch hier Interleukinrezeptoren sowie Integrine als vermehrt exprimiert detektiert werden.

4 Diskussion

Das Immunsystem ist durch die gleichmäßige Verteilung der sekundären lymphatischen Organe über den gesamten Organismus in der Lage, nach Antigenkontakt eine schnelle und effektive Immunantwort zu induzieren. Hierbei ist es wichtig, dass die Architektur der lymphatischen Organe richtig ausgebildet ist. Dies umfasst die Unterteilung der Milz in rote und weiße Pulpa, sowie die Ausbildung von B-Zellfollikeln und T-Zellzone.

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 sowie ihre Liganden CXCL13 und CCL19, CCL21 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und der Strukturierung von sekundären lymphatischen Organen spielen (Forster, 1996; Forster, 1999; Gunn, 1999; Ohl, 2003).

Um eine schnelle und effektive Immunantwort zu induzieren, ist außerdem die Wanderung der Lymphozyten durch den gesamten Organismus, aber auch innerhalb der lymphatischen Organe unerlässlich. Damit dies im Laufe der Immunantwort gewährleistet ist, exprimieren Lymphozyten während ihrer Differenzierungs- und Reifungsstadien verschiedene Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche. Homöostatische Chemokinrezeptoren, wie unter anderem CCR7 und CXCR5, sind entscheidend für die Migration von Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe und die Ausdifferenzierung der lymphatischen Organe. Andere Chemokinrezeptoren wie CCR9 und CCR10 sind für die Migration in die mukosalen Kompartimente des Organismus von Bedeutung (Wurbel, 2001; Uehara, 2002; Kunkel, 2003). Induzierbare Chemokinrezeptoren wie CXCR3 werden z.B. von reifen T-Effektorzellen exprimiert, da sie mit Hilfe dieses Rezeptors zu den Entzündungsherden im Gewebe gelangen können (Austrup, 1997; Sallusto, 1998). Das Chemokinrezeptor-expressionsprofil entscheidet somit mit über die Funktion und den Bestimmungsort der Zellen.

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass bei Mäusen der Chemokinrezeptor CXCR5 auf einer T-Zellsubpopulation nach Aktivierung der Zellen exprimiert wird. Außerdem konnte mit Hilfe von Transferexperimenten gezeigt werden, dass eine CXCR5-Expression auf T-Zellen essentiell für deren Migration in die B-Zellbereiche und der Lymphknoten ist. Des Weiteren konnte in den Peyerschen Platten unbehandelter Mäuse eine CXCR5 exprimierende T-Zellpopulation detektiert werden. Diese Population wurde in FACS-Analysen und Fluoreszenzaufnahmen phänotypisch charakterisiert, und die Unterschiede im Genexpressionsprofil von CXCR5 exprimierenden T-Zellen aus LN und PP mit Hilfe eines Mikroarrays verglichen.

4.1 Phänotypische Marker von T_{FH}-Zellen

Eine kleiner Subpopulation CD4⁺ T-Zellen exprimiert den Chemokinrezeptor CXCR5, welcher ursprünglich für B-Zellen beschrieben wurde (Forster, 1994; Forster, 1996). Diese CXCR5 exprimierenden T-Zellen wurden aufgrund ihrer Lage innerhalb des B-Zellfollikels der humanen Tonsille und ihrer Fähigkeit *in vitro* B-Zell-Hilfe zu geben, „*follicular helper T cell*“ (T_{FH}) genannt (Breitfeld, 2000; Schaerli, 2000).

Den ersten Beschreibungen der „*follicular B helper T cells*“ nach, ist der Phänotyp dieser Zellen charakterisiert durch eine CXCR5-Expression sowie eine erhöhten ICOS- und CD40L-Expression. Des Weiteren sind CCR7 und L-Selektin (CD62L), wie bei aktivierten Zellen, geringer exprimiert. Ferner lässt sich diese T-Zellsubpopulation durch ihre CD45RO⁻ (*memory*) Expression der Gruppe der Gedächtniszellen zuordnen, auch wenn sie keine eindeutigen Funktionen einer Gedächtniszelle zeigen (Breitfeld, 2000; Schaerli, 2000). Weitergehende Untersuchungen von Kim et al. zeigten, dass die Population der CXCR5 exprimierenden T-Zellen beim Menschen in zwei Subpopulationen bezüglich ihrer CD57-Expression unterteilt werden kann. So können CD57⁺CXCR5⁺ Zellen nur innerhalb der Keimzentren der Tonsillen gefunden werden. Diese Zellen sind sensitiver für CXCL13-Signale und darüber hinaus zeigten sie *in vitro* eine wesentlich effizientere B-Zellhilfe als CD57⁻CXCR5⁺ Zellen. Die Autoren betitelten diese Subpopulation als GC-T_H-Zellen (Kim, 2001). Maus-Lymphozyten exprimieren kein CD57, und zudem wurde bis jetzt noch kein anderer Marker beschrieben, der eine weitere Unterteilung der CXCR5 exprimierenden T-Zellen in der Maus beschreiben könnte. Eine weitere Analyse der humanen GC-T_H-Zellen erfolgte mit Hilfe von Mikroarrays. Kim et al. entdeckten in einer Vergleichsanalyse von GC-T_H-Zellen mit naiven T-Zellen und Effektor-Gedächtniszellen (CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻), dass in GC-T_H-Zellen die Expression von CXCL13, dem Liganden von CXCR5, stark erhöht ist (Kim, 2004).

Zusammengenommen zeigen diese Arbeiten, dass es sich bei der kleinen Subpopulation der CXCR5 exprimierenden T-Zellen um eine sehr heterogene Population handelt. Bei immer detaillierteren Unterteilungen in Subpopulationen wird sich zwangsläufig die Frage stellen, welche Merkmale eine T_{FH}-Zelle ausmachen. Sind CXCR5⁺CD57⁻ Zellen keine T_{FH}-Zellen oder reicht die Tatsache dass sie CXCR5 exprimieren in diesem Fall aus?

In der Maus existiert diese Unterteilung der T_{FH}-Population bislang nicht, da CD57 nicht existiert und ein äquivalenter Marker noch nicht beschrieben wurde. Die Expression von

CXCL13 konnte in der vorliegenden Arbeit für murine CXCR5⁺ T-Zellen weder in der Analyse mittels DNA- Mikroarray, noch histologisch (Daten nicht gezeigt) bestätigt werden. Bei den von Kim et al. analysierten Zellen handelte es sich jedoch um eine Subpopulation der CXCR5 exprimierenden Zellen, während in dieser Arbeit die gesamte Population der CXCR5 exprimierenden Zellen analysiert wurde. Es kann somit letztendlich nicht ausgeschlossen werden, dass auch in der Maus eine CXCL13 produzierende T-Zellsubpopulation existieren könnte.

4.2 Mikroarrayanalyse

4.2.1 Handelt es sich bei den CXCR5⁺ Zellen aus den PP um Effektor-Gedächtniszellen?

Die Ergebnisse, welche durch adoptive Transferversuche mit TCR-transgenen Zellen erzielt wurden zeigen, dass in der Maus nach Aktivierung auf T-Zellen CXCR5 heraufreguliert wird und diese Zellen in die B-Zellfollikel migrieren (Abb. 3.1 und Abb. 3.4).

Da die Tonsillen des Menschen, in denen die CXCR5⁺ T_{FH}-Zellen zuerst beschrieben wurden, zum MALT gehören, wurden in der vorliegenden Arbeit auch die zum MALT gehörenden PP untersucht. Hier wurde interessanter Weise eine hohe Anzahl an CXCR5 exprimierenden in naiven Mäusen nachgewiesen (Abb. 3.14). In den PP und den Tonsillen liegt ein, verglichen mit den Lymphknoten oder der Milz, anderes Milieu für die Lymphozyten vor. Beide Organe enthalten durch den ständigen Kontakt mit Nahrungsmittelantigenen und kommensalen Keimen permanent aktivierte Lymphozyten. Es ist also zu vermuten, dass die mukosale Umgebung für die Entwicklung phänotypisch anderer T-Zellsubpopulationen als im LN oder der Milz verantwortlich ist. Mehrere Arbeiten weisen darauf hin, dass die Umgebung, in der naive Lymphozyten aktiviert werden, einen Einfluss darauf hat, welche Rezeptoren exprimiert werden und wohin die Zelle sich nach ihrer Aktivierung begibt (Butcher, 1999; von Andrian, 2000). So konnten Mora et al. 2003 zeigen, dass dendritische Zellen eine entscheidende Rolle bei dem so genannten „*imprinting*“ spielen. Im Gegensatz zu DC aus der Milz oder peripheren Lymphknoten konnten nur die aus PP isolierte DC die Expression von Darm-spezifischen Integrinen auf T-Zellen induzieren (Mora, 2003).

Abbildung 3.14 zeigt, dass, in Bezug auf die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 auf CD4 positiven T-Zellen, der Unterschied zwischen mukosalem und nicht

mukosalem Umfeld in der CCR7-Expression zu finden ist. Neuste Ergebnisse zeigen jetzt, dass dendritische Zellen, je nach Herkunft, ein „*imprinting*“ von T-Zellen bezüglich der Chemokinrezeptorexpression ausüben können. So konnten Johannsson-Lindbom et al. zeigen, dass DC aus der Lamina Propria des Darms eine wesentlich stärkere Expression von CCR9 auf CD8⁺ T-Zellen induzieren können als DC aus den PP oder dem mesenterischen LN (Johannsson-Lindbom, 2005).

Um die beiden CXCR5 exprimierenden T-Zellpopulationen noch genauer zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen, wurde eine Analyse der Genexpression mittels DNA-Mikroarray durchgeführt. Ein großer Anteil der als signifikant unterschiedlich exprimiert erkannten Gene (siehe Tabelle 1+2 im Anhang) setzt sich aus bis jetzt noch nicht identifizierten ESTs (*Expressed Sequence Tags*) und Genen zusammen, welche bislang in der Literatur in keinen engeren Zusammenhang mit T-Zellen gebracht werden. Die Ergebnisse innerhalb der einzelnen Wiederholungen des Mikroarrays waren konsistent und zusätzlich konnten in dem hier analysierten Vergleich, sowie in weiteren nicht aufgeführten Vergleichen (CXCR5⁺ gegen CXCR5⁻) die Expression von CCR7 und CXCR5 als interne Kontrolle verwandt werden.

In dem Vergleich der transferierten CXCR5⁺ OT-II-transgenen Zellen aus dem LN mit den CXCR5⁺ Zellen aus den PP wurden für die Zellen aus dem PP 175 Gene als signifikant erhöht detektiert. In Tabelle 3.1 ist eine Auswahl der zehn am unterschiedlichsten exprimierten Gene aufgelistet. Durch Literaturrecherche konnte festgestellt werden, dass mindestens vier der hier aufgeführten Marker mit Gedächtniszellen beim Menschen assoziiert werden: Interleukin-7-Rezeptor wurde auf CD4 positiven Gedächtniszellen im Darm gefunden (Okada, 2005), NT5e und KLRB1 auf Integrin $\alpha_4\beta_7^+$ (*Darm-Homing*) CD45RA⁻ humanen Blut T-Zellen (Rodriguez, 2004) und Idb4 auf CD45RO⁺ humanen Blut T-Zellen (Mukasa, 1999).

Über die Funktion der genannten Moleküle auf den CXCR5 exprimierenden T-Zellen in den PP lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren. NT5e und KLRB1 werden Funktionen in der transendothelialen Migration via Integrin-Modulation zugesprochen (Airas, 1995; Poggi, 1997; Henttinen, 2003). Diese beiden Moleküle könnten somit an dem komplexen Migrationsprozess der Zellen in den Darm beteiligt sein.

Weitere exprimierte Gene sind die beiden Interleukinrezeptoren IL-1R und IL-18R, welche den T_{H1}-Effektorzellen zugeordnet werden (Okamura, 1995; Dao, 1996). Die Bindung von Interleukin-18 und IL-1 an ihre jeweiligen Rezeptoren auf den T-Zellen führt zu einer verstärkten Produktion von IFN- γ und somit einer eindeutigen Effektorfunktion. Ein weiteres Molekül, welches für eine Einordnung dieser Population in die Gruppe der Effektorzellen

spricht, ist der IL-7 Rezeptor. Zusätzlich zu der Tatsache, dass er auf Gedächtniszellen im Darm exprimiert wird ist bekannt, dass der IL-7R verstärkt auf T-Zellen exprimiert wird, welche in entzündetem Gewebe des Darms während einer Kolitis gefunden wurden (Yamazaki, 2003). Interleukin-22 gehört zur Familie der IL-10 Zytokine und wurden vorrangig auf T_{H1} -Zellen und NK-Zellen sowie in $CD4^+$ Gedächtniszellen gefunden (Wolk, 2002). Der Rezeptor für IL-22 konnte auf Gewebe des Dünndarms, des Dickdarms, der Leber sowie der Bauchspeicheldrüse gefunden werden, zudem wurde für IL-22 eine regulatorische Funktion für das angeborene Immunantwort gezeigt (Wolk, 2004).

1999 konnten Sallusto et al. zeigen, dass sich die Population der Gedächtniszellen in zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen unterteilt. Diese Einteilung erfolgte aufgrund der Expression von CCR7. So werden $CCR7^+ CD45RA^-$ Zellen als T_{CM} (*central memory*) und $CCR7^- CD45RA^-$ Zellen als T_{EM} (*effector memory*) bezeichnet. Sie unterscheiden sich neben ihrer CCR7-Expression in ihrer Effektorfunktion. T_{EM} sind in der Lage sofort nach Aktivierung ihre Effektorfunktionen auszuüben, während T_{CM} dies nicht können. Hingegen können T_{CM} jedoch sehr effektiv DC stimulieren und nach weiterer Stimulation zu CCR7 negativen Effektoren differenzieren (Sallusto, 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den CXCR5 exprimierende T-Zellen aus den PP um aktivierte, CCR7 negative Zellen handelt, welche laut DNA-Mikroarray Gene exprimieren, die einerseits mit Gedächtniszellen und andererseits mit Effektorzellen in Verbindung gebracht wurden. Dies alles legt die Hypothese nah, dass es sich bei den analysierten Zellen um $CXCR5^+ T_{EM}$ Zellen handelt. Für eine endgültige Einordnung der Zellen ist es essentiell, dass einerseits in weitergehenden Experimenten auch die Expression der jeweiligen Moleküle auf der Zelloberfläche gezeigt wird und andererseits die Funktion der $CXCR5^+$ Zellen nachgewiesen werden kann.

4.2.2 CXCR5⁺ Zellen im peripheren Lymphknoten

Der Vergleich der Genexpression der beiden CXCR5 positiven T-Zellpopulationen ergab 196 Gene, welche in den aktivierten, $CXCR5^+$ Zellen aus dem drainierenden LN signifikant höher exprimiert werden als in den $CXCR5^+$ aus den PP (Tabelle 3.2 und Anhang).

Ly6a und Ly6c gehören zu der Multigenfamilie Ly6, bei denen es sich um Moleküle mit GPI-Anker handelt. Beide Moleküle werden auf T- und anderen Lymphozytenpopulationen exprimiert, wobei Ly6a hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen zu finden ist (Ortega, 1986). Ly6c wird vor allem auf CD8 positiven T-Zellen exprimiert, aber auch aktivierte T_{H1} - als auch T_{H2} -Zellpopulationen können Ly6c exprimieren. Diese Expression führt zu einer

Inhibition der IL-2-Produktion von T_{H1}-Zellen und somit zu einem Proliferationsstopp (Yamanouchi, 1998).

Ebenfalls eine proliferationsinhibitorische Wirkung auf T-Zellen hat die Bindung von Interleukin-10 an den IL-10-Rezeptor, dessen alpha-Kette hier in der Mikroarray-Analyse auf den CXCR5⁺ OT-II-Zellen als signifikant erhöhtes Signal erscheint (siehe Tabelle 3.2). Die Bindung von IL-10 aktiviert eine Signalkaskade, welche intrazellulär mit dem IL-2-Pathway interferiert (de Waal Malefyt, 1993). Desweiteren konnte eine antiinflammatorische Wirkung von IL-10 durch die Generierung von IL-10^{-/-} Mäusen gezeigt werden. Diese Mäuse entwickeln chronische Darmentzündungen (IBD; *inflammatory bowel disease*) (Kühn, 1993).

Ein weiteres Molekül, welches mit Zellen mit regulatorischer, inhibitorischer Funktion assoziiert wird, ist Neuropilin. Dieses wird konstitutiv auf der Oberfläche regulatorischer T-Zellen (CD4⁺CD25⁺) exprimiert (Bruder, 2004). Neuropilin gehört zur Gruppe der Semaphorin III-Rezeptoren und wurde ursprünglich als Bestandteil der immunologischen Synapse beim Menschen beschrieben (Khan, 2001).

Ebenfalls erhöht ist die Expression des Interleukin-17-Rezeptors. Der IL-17-Rezeptor wird ubiquitär in den verschiedensten Geweben und auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Eine Bindung von IL-17 an seinen Rezeptor induziert in der Lunge die Expression von CXC-Chemokinen (Ye, 2001). IL-17 wird hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ T-Zellen produziert, induziert durch T_{H2}-Zytokine. Eine Expression des Rezeptors auf T-Zellen ist bis jetzt nicht beschrieben.

Die hier diskutierten Unterschiede in der Genexpression deuten darauf hin, dass die CXCR5 exprimierenden, transgenen T-Zellen, da sie vier Tagen aktiviert sind, mehrere Rezeptoren heraufreguliert haben, die eine effektive Beendigung der induzierten Immunantwort möglich machen und somit einer unkontrollierten Reaktion entgegenwirken. Die Expression von Neuropilin hingegen spricht für einen eher regulatorischen Phänotyp. Allerdings konnten keine anderen für regulatorischen T-Zellen typische Marker, wie FOXP3 und GITR bei den signifikant erhöhten Genen gefunden werden

Die durch den DNA-Mikroarray erhaltenen Daten zeigen, dass sich die CXCR5⁺ Zellen aus LN und PP trotz großer Übereinstimmungen in ihrer Genexpression, in einigen Punkten deutlich unterscheiden. Viele der identifizierten Gene deuten darauf hin, dass sich eine T-Zelle, obwohl sie der gleichen Subpopulation angehört, in vielen für die Funktion oder das Migrationsverhalten bedeutenden Merkmalen unterscheiden kann. Die gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass im Moment der Aktivierung einer T-Zelle ihrer Entwicklung eine bestimmte Richtung gegeben wird. Dieser als „*imprinting*“ bezeichnete

Prozess, kann durch lokale Einflüsse, wie Art und Herkunft der antigenpräsentierenden Zelle sowie auf die Zelle einwirkenden Zytokine beeinflusst werden.

Bei der Interpretation der durch den Mikroarray gewonnenen Daten bleibt jedoch zu bedenken, dass alle Experimente unter der Verwendung von Adjuvantien, .in diesem Fall Cholera Toxin, durchgeführt wurden. Adjuvantien stimulieren über verschiedene Toll-like-Rezeptoren das Immunsystem, was bedeutet, dass der Einsatz unterschiedlicher Adjuvantien immer auch die Ergebnisse eines Versuchs beeinflussen kann.

4.3 Die Expression von CXCR5 auf aktivierten transferierten T-Zellen

Verglichen mit der Anzahl an T_{FH} -Zellen in der humanen Tonsille zeigen histologische Untersuchungen von unter SPF-Bedingungen gehaltenen, unbehandelten Mäusen, dass hier weder in den Lymphknoten noch in der Milz eine erhöhte Anzahl an T-Zellen im B-Zellfollikel zu finden ist (siehe Abb. 3.13 und Daten nicht gezeigt). Durchflusszytometrische Analysen von murinen T-Zellen können dies belegen. Je nach Organ exprimieren nur 3-8% aller CD4 positiver Zellen CXCR5 (Abb. 3.1 und Daten nicht gezeigt).

Im Jahr 2000 konnten Ansel et al. zeigen, dass murine T-Zellen nach antigenspezifischer Aktivierung CXCR5 heraufregulieren (Ansel, 2000). In Anlehnung an diese Daten wurden in der vorliegenden Arbeit weitergehende Analysen der CXCR5-Expression auf aktivierten T-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe von adoptiven Transferexperimenten konnte gezeigt werden, dass CXCR5 36 Stunden nach antigenspezifischer Aktivierung heraufreguliert wird, die transferierten T-Zellen aber erst drei bis vier Tage nach Aktivierung anfangen, in die B-Zellfollikel des drainierenden LN zu migrieren (siehe Abb. 3.4). Dies korreliert mit der Intensität der CXCR5-Expression auf den Zellen (siehe Abb. 3.5).

Die frühe CXCR5-Expression ist wahrscheinlich das Resultat der Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen über die Bindung von OX40 an OX40L. Dass diese Bindung zu einer Heraufregulation von CXCR5 führt, zeigten Walker et al. (Walker, 1999). Die größte Anzahl CXCR5-exprimierender T-Zellen wurde in den drainierenden LN an Tag vier nach Aktivierung gefunden, zwei Tage später nimmt der Anteil CXCR5⁺ Zellen dann wieder ab (siehe Abb. 3.1). Dies kann entweder in einer verringerten CXCR5-Expression oder dem Auswandern dieser Zellen aus dem LN begründet sein.

Des Weiteren konnte in den adoptiven Transferexperimenten beobachtet werden, dass, obwohl ca. 30-40% der transferierten T-Zellen vier Tage nach Immunisierung CXCR5 exprimieren (siehe Abb. 3.1), nur eine sehr geringe Anzahl der TCR-transgenen Zellen im B-Zellfollikel zu finden ist (siehe Abb. 3.4). Durch vorangegangene Studien ist bekannt, dass bei der Migration nicht nur die Expression des jeweiligen Rezeptors sondern auch die intrazelluläre Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt. Chemokinrezeptoren sind G-Proteingekoppelt (*G-protein-coupled-receptors*; GPCR), nach Bindung des Liganden an ihre extrazelluläre Domäne werden in der Zelle heterotrimere G-Proteine aktiviert. Der Rezeptor katalysiert nach Bindung eines heterotrimere G-Proteins den Austausch von GDP gegen GTP an der entsprechenden Bindungsstelle der α -Untereinheit des G-Proteins worauf es zur einer Dissoziation der Untereinheiten kommt. Diese eingeleitete intrazelluläre Signalkaskade kann

an verschiedenen Stellen durch „*G protein exchange factors*“ (GEF), „*G protein dissociation inhibitors*“ (GDI) sowie Arrestine reguliert werden. Während GEF die Freisetzung von GDP und damit den Austausch gegen GTP beschleunigen, wirken GDI diesem Prozess entgegen (Boguski, 1993). Arrestine können an den aktivierten und somit phosphorylierten intrazellulären Bereich des Rezeptors binden und somit sterisch die Bindung von G-Proteinen stören (Gurevich, 1995). Von allen genannten Proteinen ist bekannt, dass ein Zusammenhang mit der Regulation phosphorylierter, d.h. aktivierter Chemokinrezeptoren besteht (Huttenrauch, 2002; Kohout, 2004). So lösen die Bindungen von CCL19 und CCL21 an CCR7 unterschiedliche Desensitivierungen des Rezeptors mittels β -Arrestin Rekrutierung aus. Demnach ist es möglich, dass zwar ein großer Anteil der transferierten T-Zellen CXCR5 exprimiert, es jedoch nicht zu einer ausreichenden oder einer negativ regulierten Rezeptoraktivierung und damit nicht zur Migration in den Follikel kommt.

4.3.1 „Balanced responsiveness“ von CCR7 und CXCR5 auch auf T-Zellen?

Im Verlauf der Immunantwort nimmt nicht nur die Anzahl CXCR5 exprimierender Zellen, sondern auch die Intensität der CXCR5-Expression auf den transferierten Zellen zu (siehe Abb. 3.5A). Gleichzeitig ist zu beobachten, dass bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten adoptiven Transferexperimenten CCR7 auf den transferierten T-Zellen nicht in dem Maße herunterregulieren, wie für aktivierte Zellen beschrieben (siehe Abb. 3.2). Diese Tatsache könnte in der Wahl des Adjuvants begründet sein. Dennoch konnte beobachtet werden, dass obwohl sich die Oberflächenexpression von CCR7 vier Tage nach Aktivierung der Zellen nicht deutlich reduziert hat (siehe Abb. 3.2B), die Fähigkeit der aktivierten Zellen, zu diesem Zeitpunkt in Transwell-Versuchen auf CCL21 zu migrieren, deutlich vermindert ist (siehe Abb. 3.6). Dies verdeutlicht, dass sich die Sensitivität des CCR7 nach Aktivierung im Vergleich zu naiven Zellen verändert hat. Zu dem Zeitpunkt an dem die T-Zellen beginnen in die B-Zellfollikel zu migrieren, können die Zellen sowohl Migrationssignale über CXCR5 als auch, wenn jedoch reduziert, über CCR7 prozessieren. Unter diesen experimentellen Bedingungen müssen T-Zellen, um in den B-Zellfollikel zu migrieren demzufolge einen bestimmten Schwellenwert der CXCR5-Expression überschreiten, da sie sonst durch CCR7 in der T-Zellzone gehalten werden. Die Bewegung der T-Zellen innerhalb des LN wird durch die Expression der beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 gesteuert. Diese Hypothese wird unterstützt durch Ergebnisse, die bei dem Transfer von CXCR5^{-/-} und CCR7^{-/-} T-Zellen erzielt wurden. Transferversuche mit CXCR5 defizienten, transgenen T-Zellen

demonstrieren, dass diese Zellen nicht in die Follikel migrieren. Dies betrifft die Lymphknoten (siehe Abb. 3.4), die Milz und auch die Peyerschen Platten (nicht gezeigt). Die Interaktion von CXCR5 und CXCL13 scheint somit für T-Zellen die einzige Möglichkeit zu sein, in die B-Zellbereiche der sekundären lymphatischen Organe zu gelangen. Eine fehlende CXCR5-Expression kann nicht durch andere Rezeptoren kompensiert werden.

Der Transfer von transgenen, CCR7 defizienten Zellen sowie den Transfer auf *plt/plt* Mäuse, zeigt, dass eine wesentlich größere Anzahl der T-Zellen in die B-Zellfollikel migriert, wenn sie nicht durch ein Signal via CCR7 in der T-Zellzone gehalten werden (siehe Abb. 3.7C und 3.8).

Bereits vor Jahren wurde bei der Migration von B-Zellen zwischen B-Zellfollikel und T-Zellzone beobachtet, dass die Positionierung von Zellen innerhalb des LN oder der Milz von der Expression der beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 abhängt. Die Bewegung von B-Zellen innerhalb sekundärer lymphatischer Organe wurde 1998 von Garside und Kollegen beschrieben (Garside, 1998). Sie konnten zeigen, dass B-Zellen nach Antigenkontakt aus dem B-Zellfollikel an die Grenze zwischen B- und T-Zellzone wandern, um dort mit den T-Zellen in Kontakt zu treten. Vier Jahre später demonstrierten Reif et al., dass transgene B-Zellen nach antigenspezifischer Aktivierung CCR7 heraufregulieren und gut auf CCL19 und CCL21 migrieren. Gleichzeitig zeigten sie, dass sich B-Zellen aus CCR7 defizienten Mäusen nicht aus dem B-Zellfollikel heraus bewegen und dass auch eine Überexpression von CXCR5 die Migration in Richtung T-Zellzone verhindern kann (Reif, 2002). Diese Beobachtungen definierten sie als „balanced responsiveness“.

Alle Ergebnisse aus den bis zu diesem Zeitpunkt beschriebenen Expressions- und Migrationsstudien legen nahe, dass das von Reif et al. beschriebene Prinzip der „balanced responsiveness“ auch für CXCR5 exprimierende T-Zellen zutrifft.

4.4 Funktion von T_{FH}-Zellen

Ihrem Namen nach ist die Funktion einer T_{FH}-Zelle effektive B-Zellhilfe zu geben. Durch *in vitro* B-Zellstimulationsassays mit T-Zellen aus der humanen Tonsille konnte gezeigt werden, dass die CXCR5⁺ Zellen im Vergleich zu CXCR5⁻ Zellen eine wesentlich stärkere B-Zellantwort induzieren (Breitfeld, 2000; Schaerli, 2000). Diese *in vitro* Tests lassen jedoch die Frage offen, ob die Expression von CXCR5 oder die Positionierung der T-Zellen innerhalb des B-Zellfollikels dazu führt, dass CXCR5 positive Zellen eine effektivere B-Zellhilfe geben können.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe adoptiver Transferexperimente gezeigt werden, dass CXCR5 defiziente T-Zellen *in vivo* nicht in der Lage sind, B-Zellhilfe zu geben (siehe Abb. 3.10A). Dass die verminderte Fähigkeit Immunglobulinproduktion in den B-Zellen zu induzieren mit dem fehlenden Migrationsvermögen der Zellen zusammenhängt, demonstrieren die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen. Hier zeigen murine CXCR5^{-/-} Zellen die gleiche Fähigkeit B-Zellhilfe zu geben wie wt-Zellen (siehe Abb. 3.10B). Die hier präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Migration der T-Zellen in den B-Zellfollikel ausschlaggebend für eine funktionierende B-Zellhilfe ist, da die Zellen in einem *in vitro* Assay, wo sie ohne Migration auf die B-Zellen treffen, per se in der Lage sind, B-Zellhilfe zu geben. Zusätzlich scheinen aber auch die spezifischen Umgebungsbedingungen innerhalb des B-Zellfollikels einen Einfluss auf die Entwicklung einer funktionierenden T-Helferpopulation zu haben. Innerhalb des B-Zellfollikels treffen die T-Zellen auf andere Zellpopulationen, sowie ein anderes Chemokin- bzw. Zytokinmilieu als in der T-Zellzone. Dies führt zu der Hypothese, dass die Zellen je nachdem ob sie sich in der T-Zellzone oder dem B-Zellfollikel befinden durch die unterschiedlichen dort vorherrschenden Bedingungen eine Art von „imprinting“ erfahren und zu den jeweiligen Phänotypen differenzieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der in den Versuchen von Breitfeld und Schaerli eingesetzten CXCR5⁺ Zellen aus dem B-Zellfollikel der Tonsillen isoliert wurde, da bei einer Präparation einer gesamten Tonsille keine Trennung der beiden Bereichen erfolgen kann. Die T-Zellen können demnach durch ihre CXCR5-Expression in die B-Zellfollikel migrieren und durch die dort vorherrschenden Bedingungen differenzieren sie zu effektiven T_{FH}-Zellen und induzieren somit eine effektiver B-Zellhilfe als die CXCR5 negativen T-Zellen.

Welchen Einfluss die richtige Positionierung von Zellen im Verlaufe einer Immunantwort hat, sollte in Immunisierungsexperimenten mit CXCR5^{-/-} Mäusen untersucht werden. Garside et

al. haben gezeigt, dass ein erster Kontakt an der Grenze zwischen B- und T-Zellzone durch das Auswandern der B-Zellen zustande kommt und dort die Aktivierung der B-Zellen stattfindet (Garside, 1998). Es scheint aber dennoch für den weiteren Verlauf einer Immunantwort für die T-Zellen sowie für die gesamte Immunantwort wichtig zu sein, dass sie die Fähigkeit haben, in die B-Zellfollikel zu wandern. Dort sind sie unter anderem an der Ausbildung von Keimzentren und der Induktion des Ig-Klassenwechsels beteiligt (Kelsoe, 1996). CXCR5 defiziente Mäuse haben eine destrukturierte Milz, keine inguinalen LN, sowie keine oder minimal entwickelte Peyersche Platten (Forster, 1996; Ohl, 2003). Dennoch ist eine ektopische Entwicklung von Keimzentren in der PALS-Region in diesen Mäusen möglich (Voigt, 2000). Bei der Erstbeschreibung der CXCR5 „knock out“ Maus wurde gezeigt, dass diese Mäuse zwar eine erhöhte Anzahl von B-Zellen mit verstärkter IgM-Expression aufweisen, aber dennoch nach Immunisierung mit DNP-KLH in kompletten Freund'schen Adjuvants die gleichen Mengen an IgG-Subklassen sowie IgA und IgE produzieren (Forster, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden CXCR5 defiziente Mäuse aus zwei verschiedenen Linien (C57Bl/6 und 129SV Hintergrund) mit TNP-BSA mit Cholera Toxin oder Poly I:C immunisiert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine verminderte Fähigkeit der CXCR5^{-/-} Mäuse IgG₁ und IgG_{2a} Antikörper zu produzieren. Die Mengen an TNP-spezifischem IgM waren in allen Versuchsgruppen gleich. Hier scheint die Induktion des Ig-Klassenwechsels im Vergleich zu wt-Mäusen gestört zu sein. Ob dies eindeutig damit zusammenhängt, dass die T-Zellen ohne CXCR5 nicht in die B-Zellbereiche vordringen können ist nicht ganz klar, da auch die Positionierung der B-Zellen durch ihre CXCR5-Defizienz stark beeinflusst ist.

Warum die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunisierungen von CXCR5^{-/-} Mäusen in ihren Ergebnisse von den 1996 publizierten abweichen, könnte damit erklärt werden, dass die in dieser Arbeit für die Versuche verwendeten Mäuse unter SPF-Bedingungen gehalten wurden, während dies 1996 nicht der Fall war. Somit ist nicht auszuschließen, dass damals durch Infektionen der Pool an B-Zellen schon präaktiviert war. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit andere Adjuvantien benutzt, die im Vergleich mit CFA eine nicht so starke Immunantwort induzieren. Die letztendliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bleibt ungeklärt. Genetische Variationen scheinen als Grund unwahrscheinlich, da in dieser Arbeit das gleiche Ergebnis mit Mäusen auf unterschiedlichem Hintergrund erzielt wurde.

Für die Interaktion von T- und B-Zellen in einem peripheren LN im Verlaufe einer Immunantwort kann unter anderem durch die, in dieser Arbeit neu dazu gewonnenen Erkenntnissen zusammenfassend folgendes Modell beschrieben werden:

T-Zellen werden in der T-Zellzone durch den Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen aktiviert und verweilen dort ein bis zwei Tage (Garside, 1998). In dieser Zeit beginnt ein Teil von ihnen mit der Heraufregulation von CXCR5 (siehe Abb. 3.1A). Ab Tag zwei nach Aktivierung bewegt sich ein Teil der T-Zellen in Richtung der B-Zellfollikel und trifft dort, vor allem in den Eckbereichen zwischen T- und B-Zellzone, das erste Mal auf antigenspezifische B-Zellen (Garside, 1998). Eine T-Zellsubpopulation beginnt dann ab Tag drei, in die B-Zellfollikel zu migrieren (siehe Abb. 3.4A). Dieser Migrationsprozess wird gesteuert durch die unterschiedliche Expressionsintensität von CXCR5 und CCR7. Sechs Tage nach Aktivierung verlassen die meisten T-Zellen die B-Zellfollikel wieder, und nur eine sehr kleine Population bleibt dort zurück, welche auch noch 14 Tage nach Aktivierung noch in den B-Zellfollikeln gefunden werden kann (siehe Abb. 3.4 und Daten nicht gezeigt).

Die in den B-Zellfollikeln verbleibenden T-Zellen sind dort unter anderem an der Ausbildung von Keimzentren und der Induktion des Klassenwechsels beteiligt (Kelsoe, 1996). Ohne die Expression von CXCR5 können T-Zellen nicht in die B-Zellfollikel migrieren (siehe Abb. 3.4B) und somit verglichen mit wt-Zellen keine effektive B-Zellhilfe geben (siehe Abb. 3.10A).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass die Präsenz von T-Zellen in den B-Zellfollikeln im weiteren Verlauf einer Immunantwort für eine schnelle, effektive Antikörperproduktion notwendig ist.

Literaturverzeichnis

- Airas, L., Hellman, J., Salmi, M., Bono, P., Puurunen, T., Smith, D. J. and Jalkanen, S. (1995). "CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73." J Exp Med 182(5): 1603-8.
- Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N. and Cyster, J. G. (2004). "Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5." Nat Immunol 5(9): 943-52.
- Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G. and Cyster, J. G. (1999). "In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines." J Exp Med 190(8): 1123-34.
- Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M. and Cyster, J. G. (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." Nature 406(6793): 309-14.
- Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Lohning, M., Brauer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A. and Hamann, A. (1997). "P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues." Nature 385(6611): 81-3.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature 392(6676): 565-8.
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (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(1): 34-40.
- Boguski, M. S. and McCormick, F. (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." Nature 366(6456): 643-54.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M. and Forster, R. (2000). "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." J Exp Med 192(11): 1545-52.
- Brewer, J. M., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H. and Alexander, J. (1996). "In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production." Eur J Immunol 26(9): 2062-6.
- Brocker, T., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Riedinger, M., Raykundalia, C. and Lane, P. (1999). "CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles." Eur J Immunol 29(5): 1610-6.

- Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J. and Hansen, W. (2004). "Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells." Eur J Immunol 34(3): 623-30.
- Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. and Briskin, M. (1999). "Lymphocyte trafficking and regional immunity." Adv Immunol 72: 209-53.
- Chtanova, T., Tangye, S. G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M. R., Rolph, M. S. and Mackay, C. R. (2004). "T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells." J Immunol 173(1): 68-78.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science 286(5447): 2098-102.
- Cyster, J. G. (2003). "Lymphoid organ development and cell migration." Immunol Rev 195: 5-14.
- Cyster, J. G. and Goodnow, C. C. (1995). "Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate." Immunity 3(6): 691-701.
- Dao, T., Ohashi, K., Kayano, T., Kurimoto, M. and Okamura, H. (1996). "Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells." Cell Immunol 173(2): 230-5.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H. and de Vries, J. E. (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol 150(11): 4754-65.
- Flynn, S., Toellner, K. M., Raykundalia, C., Goodall, M. and Lane, P. (1998). "CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1." J Exp Med 188(2): 297-304.
- Forkert, P. G., Thliveris, J. A. and Bertalanffy, F. D. (1977). "Structure of sinuses in the human lymph node." Cell Tissue Res 183(1): 115-30.
- Forster, R., Emrich, T., Kremmer, E. and Lipp, M. (1994). "Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells." Blood 84(3): 830-40.
- Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G. and Lipp, M. (1996). "A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen." Cell 87(6): 1037-47.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E. and Lipp, M. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell 99(1): 23-33.

- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J. and Jenkins, M. K. (1998). "Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node." Science 281(5373): 96-9.
- Grewal, I. S. and Flavell, R. A. (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." Annu Rev Immunol 16: 111-35.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T. and Nakano, H. (1999). "Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization." J Exp Med 189(3): 451-60.
- Gunn, M. D., Ngo, V. N., Ansel, K. M., Ekland, E. H., Cyster, J. G. and Williams, L. T. (1998). "A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1." Nature 391(6669): 799-803.
- Gurevich, V. V., Dion, S. B., Onorato, J. J., Ptasienski, J., Kim, C. M., Sterne-Marr, R., Hosey, M. M. and Benovic, J. L. (1995). "Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors." J Biol Chem 270(2): 720-31.
- Hardtke, S., Ohl, L. and Forster, R. (2005). "Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help." Blood 106(6): 1924-31.
- Henning, G., Ohl, L., Junt, T., Reiterer, P., Brinkmann, V., Nakano, H., Hohenberger, W., Lipp, M. and Forster, R. (2001). "CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720." J Exp Med 194(12): 1875-81.
- Henttinen, T., Jalkanen, S. and Yegutkin, G. G. (2003). "Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism." J Biol Chem 278(27): 24888-95.
- Huttenrauch, F., Nitzki, A., Lin, F. T., Honing, S. and Oppermann, M. (2002). "Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif." J Biol Chem 277(34): 30769-77.
- Inaba, K., Young, J. W. and Steinman, R. M. (1987). "Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells." J Exp Med 166(1): 182-94.
- Janeway, C. (2002). Immunobiologie.
- Johannsson-Lindbom, B., Svennsson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R. and Agace, W. W. (2005). "Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing." J Exp Med 202(8): 1063-1073.
- Karagouni, E. E. and Hadjipetrou-Kourounakis, L. (1990). "Regulation of isotype immunoglobulin production by adjuvants in vivo." Scand J Immunol 31(6): 745-54.

- Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y. and Jenkins, M. K. (1994). "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo." Immunity 1(4): 327-39.
- Kelly, R. H. (1970). "Localization of afferent lymph cells within the draining node during a primary immune response." Nature 227(5257): 510-3.
- Kelsoe, G. (1996). "Life and death in germinal centers (redux)." Immunity 4(2): 107-11.
- Khan, A. A., Bose, C., Yam, L. S., Soloski, M. J. and Rupp, F. (2001). "Physiological regulation of the immunological synapse by agrin." Science 292(5522): 1681-6.
- Kim, C. H., Lim, H. W., Kim, J. R., Rott, L., Hillsamer, P. and Butcher, E. C. (2004). "Unique gene expression program of human germinal center T helper cells." Blood 104(7): 1952-60.
- Kim, C. H., Rott, L. S., Clark-Lewis, I., Campbell, D. J., Wu, L. and Butcher, E. C. (2001). "Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells." J Exp Med 193(12): 1373-81.
- Kohout, T. A., Nicholas, S. L., Perry, S. J., Reinhart, G., Junger, S. and Struthers, R. S. (2004). "Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7." J Biol Chem 279(22): 23214-22.
- Kühn, R. J., Lohler, D., K, R., K, R. and W, M. (1993). "Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell 75: 263-274.
- Kunkel, E. J., Kim, C. H., Lazarus, N. H., Vierra, M. A., Soler, D., Bowman, E. P. and Butcher, E. C. (2003). "CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells." J Clin Invest 111(7): 1001-10.
- Lane, P., Burdet, C., Hubele, S., Scheidegger, D., Muller, U., McConnell, F. and Kosco-Vilbois, M. (1994). "B cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4+ T cells." J Exp Med 179(3): 819-30.
- Ledbetter, J. A., Rose, L. M., Spooner, C. E., Beatty, P. G., Martin, P. J. and Clark, E. A. (1985). "Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL 2 receptor expression." J Immunol 135(3): 1819-25.
- Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G. and Cyster, J. G. (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(23): 12694-9.
- Macatonia, S. E., Knight, S. C., Edwards, A. J., Griffiths, S. and Fryer, P. (1987). "Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies." J Exp Med 166(6): 1654-67.

- Mackay, C. R. (2000). "Follicular homing T helper (Th) cells and the Th1/Th2 paradigm." J Exp Med 192(11): F31-4.
- MacLennan, I. C. (1994). "Germinal centers." Annu Rev Immunol 12: 117-39.
- Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." Nature 427(6972): 355-60.
- Moore, B. B., Keane, M. P., Addison, C. L., Arenberg, D. A. and Strieter, R. M. (1998). "CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family." J Investig Med 46(4): 113-20.
- Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M. and Von Andrian, U. H. (2003). "Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells." Nature 424(6944): 88-93.
- Moser, B., Loetscher, M., Piali, L. and Loetscher, P. (1998). "Lymphocyte responses to chemokines." Int Rev Immunol 16(3-4): 323-44.
- Moser, M. and Murphy, K. M. (2000). "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development." Nat Immunol 1(3): 199-205.
- Mukasa, R., Homma, T., Hosono, O., Yoshino, S., Nishioka, K., Fukuda, M. and Morimoto, C. (1999). "Human T lymphocyte populations which bind to P- or E-selectin are enriched with cells expressing core 2 O-glycans." Immunol Lett 67(2): 117-24.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B. and Loh, D. Y. (1990). "Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo." Science 250(4988): 1720-3.
- Nakano, H., Tamura, T., Yoshimoto, T., Yagita, H., Miyasaka, M., Butcher, E. C., Nariuchi, H., Kakiuchi, T. and Matsuzawa, A. (1997). "Genetic defect in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymph nodes." Eur J Immunol 27(1): 215-21.
- O'Garra, A., McEvoy, L. M. and Zlotnik, A. (1998). "T-cell subsets: chemokine receptors guide the way." Curr Biol 8(18): R646-9.
- Ohl, L., Henning, G., Krautwald, S., Lipp, M., Hardtke, S., Bernhardt, G., Pabst, O. and Forster, R. (2003). "Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs." J Exp Med 197(9): 1199-204.
- Okada, E., Yamazaki, M., Tanabe, M., Takeuchi, T., Nanno, M., Oshima, S., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Kanai, T., Hibi, T. and Watanabe, M. (2005). "IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7R $^{\text{high}}$ CD4 $^{+}$ mucosal T cells in mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288(4): G745-54.
- Okada, T., Ngo, V. N., Eklund, E. H., Forster, R., Lipp, M., Littman, D. R. and Cyster, J. G. (2002). "Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches." J Exp Med 196(1): 65-75.

- Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K. and et al. (1995). "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." Nature 378(6552): 88-91.
- Ortega, G., Korty, P. E., Shevach, E. M. and Malek, T. R. (1986). "Role of Ly-6 in lymphocyte activation. I. Characterization of a monoclonal antibody to a nonpolymorphic Ly-6 specificity." J Immunol 137(10): 3240-6.
- Perrin, P. J., Davis, T. A., Smoot, D. S., Abe, R., June, C. H. and Lee, K. P. (1997). "Mitogenic stimulation of T cells reveals differing contributions for B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulation." Immunology 90(4): 534-42.
- Pinschewer, D. D., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (2000). "FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory." J Immunol 164(11): 5761-70.
- Poggi, A., Costa, P., Zocchi, M. R. and Moretta, L. (1997). "NKR1A molecule is involved in transendothelial migration of CD4+ human T lymphocytes." Immunol Lett 57(1-3): 121-3.
- Reif, K., Ekland, E. H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R. and Cyster, J. G. (2002). "Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position." Nature 416(6876): 94-9.
- Rodriguez, M. W., Paquet, A. C., Yang, Y. H. and Erle, D. J. (2004). "Differential gene expression by integrin beta 7+ and beta 7- memory T helper cells." BMC Immunol 5(1): 13.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature 401(6754): 708-12.
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. and Lanzavecchia, A. (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." J Exp Med 187(6): 875-83.
- Sallusto, F., Mackay, C. R. and Lanzavecchia, A. (1997). "Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells." Science 277(5334): 2005-7.
- Sanders, M. E., Makgoba, M. W. and Shaw, S. (1988). "Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets." Immunol Today 9(7-8): 195-9.
- Schaerli, P., Loetscher, P. and Moser, B. (2001). "Cutting edge: induction of follicular homing precedes effector Th cell development." J Immunol 167(11): 6082-6.
- Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P. and Moser, B. (2000). "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function." J Exp Med 192(11): 1553-62.

- Sprent, J. and Basten, A. (1973). "Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II. Lifespan." Cell Immunol 7(1): 40-59.
- Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol 57: 827-72.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A 98(9): 5116-21.
- Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J. M. and Love, P. E. (2002). "A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration." J Immunol 168(6): 2811-9.
- Unsoeld, H., Krautwald, S., Voehringer, D., Kunzendorf, U. and Pircher, H. (2002). "Cutting edge: CCR7+ and CCR7- memory T cells do not differ in immediate effector cell function." J Immunol 169(2): 638-41.
- Veerman, A. J. and van Ewijk, W. (1975). "White pulp compartments in the spleen of rats and mice. A light and electron microscopic study of lymphoid and non-lymphoid celltypes in T- and B-areas." Cell Tissue Res 156(4): 417-41.
- Voigt, I., Camacho, S. A., de Boer, B. A., Lipp, M., Forster, R. and Berek, C. (2000). "CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone." Eur J Immunol 30(2): 560-7.
- von Andrian, U. H. and Mackay, C. R. (2000). "T-cell function and migration. Two sides of the same coin." N Engl J Med 343(14): 1020-34.
- Walker, L. S., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Brocker, T., Raykundalia, C., Goodall, M., Forster, R., Lipp, M. and 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(8): 1115-22.
- Wallace, D. L. and Beverley, P. C. (1990). "Phenotypic changes associated with activation of CD45RA+ and CD45RO+ T cells." Immunology 69(3): 460-7.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K. and Sabat, R. (2002). "Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?" J Immunol 168(11): 5397-402.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K. and Sabat, R. (2004). "IL-22 increases the innate immunity of tissues." Immunity 21(2): 241-54.
- Wurbel, M. A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, M. C., Richelme, M., Carrier, A. and Malissen, B. (2001). "Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gammadelta(+) gut intraepithelial lymphocytes." Blood 98(9): 2626-32.
- Yamanouchi, S., Kuwahara, K., Sakata, A., Ezaki, T., Matsuoka, S., Miyazaki, J., Hirose, S., Tamura, T., Nariuchi, H. and Sakaguchi, N. (1998). "A T cell activation antigen, Ly6C, induced on CD4+ Th1 cells mediates an inhibitory signal for secretion of IL-2 and proliferation in peripheral immune responses." Eur J Immunol 28(2): 696-707.

- Yamazaki, M., Yajima, T., Tanabe, M., Fukui, K., Okada, E., Okamoto, R., Oshima, S., Nakamura, T., Kanai, T., Uehira, M., Takeuchi, T., Ishikawa, H., Hibi, T. and Watanabe, M. (2003). "Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis." J Immunol 171(3): 1556-63.
- Yanagawa, Y., Hoshino, Y., Kataoka, H., Kawaguchi, T., Ohtsuki, M., Sugahara, K. and Chiba, K. (1999). "FTY720, a novel immunosuppressant, prolongs rat skin allograft survival by decreasing T-cell infiltration into grafts." Transplant Proc 31(1-2): 1227-9.
- Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J. J. and Kolls, J. K. (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med 194(4): 519-27.
- Young, J. W. and Steinman, R. M. (1990). "Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells." J Exp Med 171(4): 1315-32.
- Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity 12(2): 121-7.

Anhang

Tabelle 1: Gene die in PP signifikant höher exprimiert werden

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
AK084291	1069	AK084291	0,854	0,014	10,89
NM_011851	1382	Nt5e	1,445	0,000	9,71
NM_023049	1116	Asb2	1,461	0,000	8,82
AK037373	454	A130012F09	0,826	0,014	8,69
NM_016971	2806	Il22	1,953	0,000	8,20
NM_010555	1753	Il1r2	1,820	0,000	8,09
NM_017399	3991	Fabp1	1,767	0,000	7,67
NAP060483-1	1070	NAP060483-1	0,911	0,006	7,38
NM_011036	3172	Pap	1,644	0,000	6,97
NM_010479	2765	Hspa1a	1,567	0,000	6,90
NM_025312	1185	Sostdc1	1,211	0,000	6,22
NM_023122	1201	Gpm6b	1,450	0,000	6,21
AB034730	2337	Prg4	1,422	0,000	5,82
AK122523	3494	Whrn	1,511	0,000	5,77
NM_026324	949	Kirrel3	0,891	0,006	5,73
NM_019793	4338	Tm4sf8	1,300	0,000	5,50
BC055922	821	BC055922	1,687	0,000	5,15
NM_010423	3601	Hey1	1,376	0,000	5,08
NM_009373	4715	Tgm2	1,375	0,000	5,05
NM_145603	3665	Ces2	1,203	0,000	5,05
NM_027211	1198	Anxa13	1,486	0,000	4,98
NM_010495	1046	Idb1	1,158	0,000	4,90
L47240	1620	Erbp3	1,018	0,000	4,76
NM_008372	1320	Il7r	1,063	0,000	4,75
AK015152	717	4930415N18Rik	1,108	0,000	4,69
AK041006	1068	AK041006	0,914	0,006	4,67
AB114827	2256	BC038881	1,101	0,000	4,64
AB011255	107	Pcdh7	0,943	0,003	4,61
NM_016711	384	Tmod2	1,160	0,000	4,57
NM_027881	3078	Osbpl3	1,247	0,000	4,52
NM_008115	1033	Gfra2	0,943	0,003	4,47
NM_177161	924	P4ha3	1,149	0,000	4,32
AK030647	3122	AK030647	1,590	0,000	4,27
NM_019485	3318	Olf70	0,912	0,006	4,27
ENSMUST00000062426	4111	ENSMUST00000062426	1,529	0,000	4,26
AK053861	4777	Opa1	1,220	0,000	4,20
NM_007807	4416	Cybb	1,083	0,000	4,18
NM_145555	1216	A330049M08Rik	1,363	0,000	4,17
NM_009721	540	Atp1b1	1,602	0,000	4,13
AK006128	756	Abcc3	1,369	0,000	3,96
NM_026887	413	Ap1s2	1,007	0,000	3,93
BC002262	4300	Al428795	1,334	0,000	3,90
AK002875	4324	AK002875	1,205	0,000	3,87
XM_127441	1601	Irx1	0,882	0,006	3,85
NM_025768	3886	Grtp1	1,280	0,000	3,82
NM_010479	4251	Hspa1a	1,058	0,000	3,77
AK030614	997	AK030614	0,926	0,006	3,76
NM_175119	616	1300007C21Rik	1,221	0,000	3,72
XM_357606	3815	LOC384374	0,855	0,014	3,70
NM_177678	170	Ablim2	1,135	0,000	3,70
AK080546	1276	Cd9	0,962	0,003	3,69
BC006942	2670	BC006942	0,975	0,003	3,59

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
NM_018870	1283	Pgam2	1,294	0,000	3,57
BC026382	4163	Gpr155	0,961	0,003	3,57
AK035407	573	AK035407	0,944	0,003	3,56
NM_145533	4446	Smox	1,057	0,000	3,52
AK009669	1933	2310037P21Rik	1,249	0,000	3,50
AK047788	60	C030040A22Rik	0,988	0,003	3,49
ENSMUST00000065235	3768	Defcr2	1,391	0,000	3,48
NM_023256	1423	9030623C06Rik	1,200	0,000	3,46
NM_011851	2706	Nt5e	1,257	0,000	3,45
AK051762	101	AK051762	1,011	0,000	3,43
NM_031166	117	ldb4	0,875	0,006	3,39
NM_007972	1242	F10	0,988	0,003	3,37
NM_177329	3881	A530053G22Rik	1,161	0,000	3,35
AK018205	724	6330437I11Rik	0,897	0,006	3,32
NM_010430	4359	Hic1	1,048	0,000	3,31
AK045222	3962	AK045222	1,358	0,000	3,31
BE995132	1891	BE995132	1,259	0,000	3,30
BC031136	1716	BC030417	0,890	0,006	3,30
TC1069174	4074	TC1069174	0,947	0,003	3,29
NM_023612	3783	Esm1	1,141	0,000	3,28
NM_016971	1004	Il22	1,108	0,000	3,25
NM_008377	4612	Lrig1	1,062	0,000	3,24
BC006845	2451	Pde2a	1,239	0,000	3,22
BC022659	3743	0610007P22Rik	1,017	0,000	3,22
AK087437	737	B130066H01Rik	1,090	0,000	3,22
NM_173766	4150	A630023P12Rik	1,064	0,000	3,22
NM_175480	4574	Zfp612	1,160	0,000	3,17
NM_011377	1829	Sim2	0,978	0,003	3,15
X01643	789	X01643	1,320	0,000	3,14
BU709352	3625	BU709352	1,036	0,000	3,14
NM_020268	3978	Klk27	1,205	0,000	3,14
NM_198420	2237	D15Wsu169e	1,237	0,000	3,13
NM_026415	653	2310002J15Rik	0,896	0,006	3,12
NM_146163	1338	Myo1h	1,139	0,000	3,12
NM_177632	255	BC022623	1,098	0,000	3,10
BC055922	580	BC055922	1,332	0,000	3,10
AK015235	4153	4930429F11Rik	0,849	0,014	3,09
M11154	2018	Myh3	1,048	0,000	3,07
NM_198171	2027	BC015286	0,863	0,014	3,07
AK012039	1668	2610317O13Rik	0,983	0,003	3,04
NM_153782	2069	BC029169	0,852	0,014	3,04
AK039156	3683	2210415K24Rik	1,122	0,000	3,03
NM_019793	3700	Tm4sf8	0,911	0,006	3,02
NM_145475	3610	Cerk	1,186	0,000	3,02
NM_201600	214	Myo5b	0,871	0,006	3,00
CA326272	177	Oaz3	0,879	0,006	2,99
AK019835	4160	Pard6g	0,902	0,006	2,99
NM_145602	1520	Ndr4	1,176	0,000	2,99
NM_008365	4539	Il18r1	1,239	0,000	2,98
NM_009450	931	Tubb2	0,832	0,014	2,98
NM_013464	2575	Ahr	1,069	0,000	2,97
AK018108	2157	6330403N15Rik	0,903	0,006	2,97
X01642	3192	X01642	1,252	0,000	2,96
NM_010576	3874	Itga4	1,124	0,000	2,96
AK129143	4676	Setbp1	1,153	0,000	2,95
NM_017474	1364	Ctca3	1,228	0,000	2,94
NM_053117	2728	Pard6g	0,924	0,006	2,92

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
NM_030887	803	Jundm2	1,051	0,000	2,92
NM_008608	2830	Mmp14	1,012	0,000	2,92
NM_010287	3565	Gpr83	1,050	0,000	2,91
NM_031170	4610	Krt2-8	1,212	0,000	2,91
AK040970	743	AK040970	0,843	0,014	2,88
NM_011260	2904	Reg3g	1,107	0,000	2,86
AK005815	1314	8030451A03Rik	1,040	0,000	2,85
NM_172442	881	Dtx4	1,105	0,000	2,85
BC002195	1803	BC002195	0,919	0,006	2,83
NM_173781	4156	Rab6b	1,064	0,000	2,80
NM_013649	4173	Ryk	1,070	0,000	2,79
NM_144796	4068	E430021N18Rik	0,923	0,006	2,77
NM_020331	1542	Gtf2ird1	0,991	0,003	2,77
NM_134038	393	Slc16a6	1,043	0,000	2,77
AK037794	913	AK037794	1,173	0,000	2,77
M64085	477	Serpina3g	0,927	0,006	2,73
AK037667	1457	AK037667	0,922	0,006	2,72
NM_145149	447	Rasgrp4	0,989	0,003	2,70
NM_010555	4398	Il1r2	0,985	0,003	2,70
AK030576	4331	C230094A16Rik	0,902	0,006	2,69
BB490675	3822	BB490675	0,961	0,003	2,69
NM_009509	3693	Vil1	1,078	0,000	2,67
NM_008875	202	Pld1	0,955	0,003	2,67
NM_010479	4083	Hspa1a	0,935	0,006	2,67
BC049975	2554	BC049975	1,020	0,000	2,66
NM_133687	3617	Cxyc5	1,061	0,000	2,65
NM_009509	3086	Vil1	1,069	0,000	2,64
AK048224	2769	AK048224	1,107	0,000	2,63
NM_178165	712	A230020G22Rik	0,982	0,003	2,63
BC030075	2809	Tcrb-V13	1,055	0,000	2,63
A_52_P139439	1340	A_52_P139439	0,848	0,014	2,62
NR_001463	1281	Xist	1,330	0,000	2,62
M92088	3492	Krt2-10	1,117	0,000	2,61
NM_178165	3764	A230020G22Rik	0,872	0,006	2,61
AK030587	1864	AK030587	0,836	0,014	2,59
NM_026473	3194	2310057H16Rik	1,097	0,000	2,59
NM_019790	2260	Tmeff2	0,889	0,006	2,59
NM_145449	1515	1810023F06Rik	1,121	0,000	2,57
NM_133687	4755	Cxyc5	0,917	0,006	2,57
NM_009504	750	Vdr	0,833	0,014	2,57
NAP043508-1	901	NAP043508-1	0,925	0,006	2,55
X59289	4105	Xist	1,671	0,000	2,55
X59289	4390	Xist	1,569	0,000	2,55
NM_177544	3770	Ang4	0,932	0,006	2,54
NM_007980	4427	Fabp2	1,098	0,000	2,54
Y18276	1728	Nbea	0,958	0,003	2,53
NM_008586	2115	Mep1b	0,875	0,006	2,52
NM_010759	1248	Mageb1	0,897	0,006	2,52
NM_134251	2520	Slc12a8	1,071	0,000	2,49
NM_144786	4169	Ggtl3	0,934	0,006	2,49
XM_133071	405	Mgam	0,889	0,006	2,47
XM_132249	3230	2310015L07Rik	1,010	0,000	2,47
XM_354614	2949	Myh3	1,078	0,000	2,46
AK044853	2206	D19Erttd737e	0,865	0,006	2,45
AK034659	508	Lpp	1,018	0,000	2,45
NM_153158	4467	E130308A19Rik	0,829	0,014	2,45
AK002875	3944	AK002875	0,830	0,014	2,44

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
BU936806	3198	BU936806	0,973	0,003	2,43
AK082962	2216	Taf6l	0,890	0,006	2,42
NM_207217	102	Al429612	0,897	0,006	2,39
NM_146187	882	Gpr43	0,891	0,006	2,39
AK021193	855	C330008K14Rik	0,849	0,014	2,38
AK005888	2258	1700012B07Rik	1,019	0,000	2,37
NM_020577	492	As3mt	0,883	0,006	2,36
NM_175449	4590	A630077B13Rik	0,896	0,006	2,36
AK032026	3871	Slc16a6	0,942	0,003	2,33
AK081258	1082	AK081258	0,960	0,003	2,32
NM_008281	914	Hpn	0,923	0,006	2,32
NM_027971	2428	Fbn2	0,878	0,006	2,32
NM_024406	4119	Fabp4	0,938	0,003	2,31
NM_012040	1971	Pnck	0,931	0,006	2,31
NM_177624	3139	A430083B19Rik	0,955	0,003	2,30
AK041527	4271	Gpr83	0,898	0,006	2,29
AK122233	1655	Spock2	0,865	0,006	2,29
AK038235	2588	C030018K18Rik	1,041	0,000	2,28
TC950516	1782	TC950516	1,022	0,000	2,28
AK129115	2286	Akap6	0,937	0,003	2,27
AK034301	3566	9330175B01Rik	0,862	0,014	2,26
AK048541	2391	AK048541	0,939	0,003	2,25
AK031091	4302	AK031091	0,854	0,014	2,25
AK035075	4296	AK035075	1,016	0,000	2,23
AK089106	1596	D4Ert196e	0,992	0,003	2,21
NM_146009	2178	NM_146009	0,888	0,006	2,20
NM_010850	1307	Mycs	0,913	0,006	2,19
NM_008939	2048	Prss12	0,885	0,006	2,17
NM_144903	2997	Aldob	0,880	0,006	2,17
NM_011281	1630	Rorc	0,892	0,006	2,17
NM_029343	2272	1700030K01Rik	0,921	0,006	2,17
NM_201410	3928	Ugt1a9	0,856	0,014	2,16
NM_010737	3387	Klrb1a	0,853	0,014	2,16
NM_007595	840	Camk2b	0,942	0,003	2,16
AF111166	2138	Ryr3	0,942	0,003	2,15
NM_007852	3544	Defcr6	0,877	0,006	2,15
AF138745	754	Tsix	0,880	0,006	2,14
TC995160	2435	Csng	0,970	0,003	2,13
NM_011575	3162	Tff3	0,910	0,006	2,13
BC027668	506	Gm566	0,898	0,006	2,12
NM_011607	4002	Tnc	0,872	0,006	2,12
NM_029643	3344	Gpr172b	0,830	0,014	2,12
NM_009295	4531	Stxbp1	0,878	0,006	2,12
XM_355654	3788	XM_355654	0,906	0,006	2,09
TC1081837	853	TC1081837	0,858	0,014	2,08
NM_010031	4075	Defcr	0,876	0,006	2,06
BC050099	2248	BC050099	0,887	0,006	2,05
AK012596	1822	Tdrkh	0,869	0,006	2,03
NM_029639	2488	1600029D21Rik	0,882	0,006	2,00
NM_010576	3568	Itga4	0,838	0,014	1,99
AK083909	3524	C030011O14Rik	0,880	0,006	1,97
NAP112875-1	2834	NAP112875-1	0,859	0,014	1,91
XM_128535	2782	XM_128535	0,847	0,014	1,78
AK036977	3140	9930032E11Rik	0,829	0,014	1,64
BG067153	2991	BG067153	0,932	0,006	1,63
BC023719	3399	BC023719	0,958	0,003	1,60
NM_008089	3237	Gata1	0,892	0,006	1,25

Tabelle 2: Gene die auf OTII Zellen aus LN höher exprimiert werden

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
NM_008219	596	Hbb-bh1	-3,870	0,000	0,0188
XM_135482	2943	XM_135482	-3,513	0,000	0,0324
XM_356768	3097	XM_356768	-2,817	0,000	0,0522
NM_008726	4666	Nppb	-2,689	0,000	0,0633
NM_010578	3476	Itgb1	-1,950	0,000	0,0782
NM_012011	3816	Eif2s3y	-1,619	0,000	0,0795
BC030392	3442	BC030392	-1,014	0,003	0,0966
NM_011313	2039	S100a6	-2,063	0,000	0,1208
NM_007799	98	Ctse	-2,444	0,000	0,1424
NM_011161	3627	Mapk11	-1,824	0,000	0,1464
AK052715	4459	Chdh	-1,901	0,000	0,1850
NM_172449	2121	Bzrap1	-1,848	0,000	0,1865
NM_010578	4704	Itgb1	-1,694	0,000	0,1882
AF012177	3426	AF012177	-1,553	0,000	0,2095
NM_008737	1680	Nrp1	-1,484	0,000	0,2192
NM_010212	3190	Fhl2	-1,422	0,000	0,2222
AK046100	3832	AK046100	-1,172	0,000	0,2293
NM_011346	4122	Sell	-1,808	0,000	0,2336
NM_019583	4625	Il17rb	-1,833	0,000	0,2445
XM_146275	1050	Gm500	-1,233	0,000	0,2497
NM_010738	3448	Ly6a	-1,505	0,000	0,2536
NM_007955	4713	Ptpv	-1,505	0,000	0,2609
NM_010741	2348	Ly6c	-1,494	0,000	0,2617
NM_008908	3400	Ppic	-1,504	0,000	0,2669
NM_012008	4511	Ddx3y	-1,244	0,000	0,2672
NM_008452	3940	Klf2	-1,570	0,000	0,2774
AK034012	956	Synpo	-1,329	0,000	0,2785
NM_145226	3052	Oas3	-1,177	0,000	0,2902
NM_173442	1333	Gcnt1	-1,313	0,000	0,2933
NM_026461	1702	1700129C05Rik	-1,190	0,000	0,3036
NM_021718	3949	Ms4a4b	-1,201	0,000	0,3047
AK129255	2195	Chsy1	-1,400	0,000	0,3058
TC1062855	4433	TC1062855	-1,243	0,000	0,3066
NM_176996	1302	Smo	-1,415	0,000	0,3154
NM_133851	2889	Nusap1	-1,183	0,000	0,3255
NM_146932	3557	Olfir802	-1,344	0,000	0,3257
NM_022318	4457	Popdc2	-1,369	0,000	0,3325
AK044147	3757	AK044147	-1,086	0,000	0,3358
NM_139144	1494	Ogt	-1,036	0,003	0,3396
BC021494	782	1110004P15Rik	-1,240	0,000	0,3400
AK050252	3290	AK050252	-1,266	0,000	0,3420
NM_010581	4268	Cd47	-1,249	0,000	0,3426
NM_181072	662	Myo1e	-1,175	0,000	0,3438
NM_178877	4388	C80638	-1,165	0,000	0,3461
NM_011701	2364	Vim	-1,096	0,000	0,3463
AK048907	2433	Pla2g1br	-1,111	0,000	0,3473
NM_021718	2058	Ms4a4b	-1,027	0,003	0,3495
NM_025658	2166	Ms4a4d	-0,924	0,014	0,3512
NM_011311	1956	S100a4	-1,136	0,000	0,3514
NM_025384	1911	Dnajd1	-1,183	0,000	0,3545
NM_013524	2194	Fut7	-1,272	0,000	0,3563
NM_008320	3643	Icsbp1	-1,084	0,000	0,3566
AK029311	3830	4832420A03Rik	-0,903	0,014	0,3590
NM_029499	4003	Ms4a4c	-1,030	0,003	0,3605
AK020213	3339	Ddx3y	-0,959	0,006	0,3607
NM_023258	3826	Pycard	-1,040	0,003	0,3646

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
NM_153546	2880	Oact1	-1,053	0,003	0,3683
AK043457	2398	E2f2	-1,055	0,003	0,3693
NM_011623	3319	Top2a	-1,107	0,000	0,3700
NM_207653	3779	Cflar	-1,316	0,000	0,3732
NM_008060	3206	Ganab	-1,043	0,003	0,3736
NM_016861	2133	Pdlim1	-1,130	0,000	0,3738
NM_009858	2582	Cd8b	-1,148	0,000	0,3742
TC951701	1206	TC951701	-0,939	0,014	0,3755
NM_010161	3890	Evi2a	-1,036	0,003	0,3779
AK017739	4265	Prkcn	-1,198	0,000	0,3782
NM_021488	4058	Ghrl	-0,929	0,014	0,3797
NM_172787	2074	L3mbtl3	-0,980	0,006	0,3803
NAP025883-1	4308	NAP025883-1	-0,990	0,006	0,3842
BC052824	4391	Cd3z	-0,973	0,006	0,3850
NM_009518	2003	Wnt10a	-0,952	0,006	0,3875
NM_008348	4185	Il10ra	-1,022	0,003	0,3879
NM_025311	4311	D14Ert449e	-1,051	0,003	0,3885
NM_010444	4718	Nr4a1	-0,997	0,006	0,3891
AK050699	1932	D030005H02Rik	-1,109	0,000	0,3892
BG084382	1317	BG084382	-0,905	0,014	0,3928
NM_175091	2705	Tnks	-0,933	0,014	0,3932
NM_011509	3879	Supt4h2	-1,016	0,003	0,3937
NM_009122	2350	Satb1	-0,892	0,014	0,3951
NM_029000	3561	9130002C22Rik	-1,060	0,003	0,3968
TC957764	289	TC957764	-0,911	0,014	0,3997
XM_282993	3758	LOC327957	-1,274	0,000	0,4022
NM_023258	1663	Pycard	-0,973	0,006	0,4040
NM_009759	3618	Bmx	-1,170	0,000	0,4044
NM_021718	1174	Ms4a4b	-0,978	0,006	0,4061
AK129176	2773	4933432P15Rik	-0,911	0,014	0,4062
NM_012010	2915	Eif2s3x	-0,909	0,014	0,4071
AB081756	3578	Bclp2	-1,040	0,003	0,4080
NM_013472	1812	Anxa6	-1,118	0,000	0,4083
AK014880	3125	Armc3	-1,146	0,000	0,4111
AK034750	3335	4833408D11Rik	-1,029	0,003	0,4115
XM_283603	2941	Laf4	-0,901	0,014	0,4142
AK036518	1682	Myb	-1,006	0,003	0,4150
AK030649	2563	Dhrsx	-1,094	0,000	0,4152
AK004236	2928	1110053F04Rik	-1,211	0,000	0,4163
AK129197	3281	2900016B01Rik	-0,926	0,014	0,4169
AK040746	3288	AK040746	-0,979	0,006	0,4185
AK078299	2509	Egr3	-0,897	0,014	0,4186
NM_145947	1605	Slc26a7	-1,021	0,003	0,4223
AK084674	2201	AK084674	-1,094	0,000	0,4234
AB026045	113	Ms4a4c	-0,914	0,014	0,4240
NM_029803	2289	2310061N23Rik	-0,908	0,014	0,4245
BC039931	3775	BC039931	-0,990	0,006	0,4248
NM_016966	1994	Phgdh	-0,902	0,014	0,4262
NM_028769	4724	Syvn1	-0,895	0,014	0,4281
NM_008965	2165	Ptger4	-1,000	0,003	0,4290
AK079805	1844	D430040G12Rik	-0,972	0,006	0,4301
NM_029943	3606	Apex2	-1,020	0,003	0,4317
NM_029000	1187	9130002C22Rik	-0,891	0,014	0,4338
NM_010579	2130	Itgb4bp	-0,984	0,006	0,4343
NM_172909	657	E430002D04Rik	-0,978	0,006	0,4348
NM_133229	1113	Dscr6	-1,129	0,000	0,4348
NM_008668	773	Nab2	-0,986	0,006	0,4354
NM_198664	2407	TC1088182	-0,895	0,014	0,4364

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
TC947166	3323	TC947166	-0,904	0,014	0,4385
BC021494	1271	1110004P15Rik	-0,897	0,014	0,4396
NM_008017	3322	Smc2l1	-0,995	0,006	0,4401
NM_011623	1796	Top2a	-0,912	0,014	0,4410
NM_145226	1898	Oas3	-1,144	0,000	0,4437
NM_010016	3506	Daf1	-1,036	0,003	0,4465
NM_172729	1746	Card4	-0,934	0,014	0,4478
AK015286	3715	Tac1	-1,003	0,003	0,4501
NM_007585	2450	Anxa2	-0,918	0,014	0,4540
NM_144923	3019	Blvrb	-0,942	0,014	0,4558
NM_013658	4152	Sema4a	-0,932	0,014	0,4562
NM_146796	4238	Olf1499	-1,034	0,003	0,4597
NAP028759-1	3957	NAP028759-1	-1,027	0,003	0,4599
r60_a9	2829	r60_a9	-0,913	0,014	0,4601
XM_283319	3023	1200016G03Rik	-1,025	0,003	0,4615
AK081516	3073	AK081516	-1,031	0,003	0,4616
NM_009238	3804	Sox4	-0,928	0,014	0,4623
AK040447	1227	Nrp1	-1,041	0,003	0,4638
NM_009810	3994	Casp3	-0,939	0,014	0,4642
NM_145375	3658	Tm6sf1	-1,043	0,003	0,4666
NM_008409	4748	Itn2a	-0,956	0,006	0,4730
AK042712	3007	AK042712	-1,008	0,003	0,4755
NM_022332	2750	Lrp12	-1,190	0,000	0,4795
NM_029239	4764	Prkcn	-0,959	0,006	0,4808
NM_008737	4187	Nrp1	-0,981	0,006	0,4828
AK005770	1857	Rhobtb1	-0,996	0,006	0,4847
AK080781	706	AK080781	-0,929	0,014	0,4877
NM_007871	1905	Dnm2	-1,074	0,000	0,4886
NM_007719	1376	Ccr7	-0,906	0,014	0,4908
NM_009771	4351	Btrc	-0,934	0,014	0,4929
NM_182841	1587	BC062109	-0,966	0,006	0,4942
NM_153092	2939	Nupl2	-0,979	0,006	0,4948
NM_007955	728	Ptprv	-0,980	0,006	0,4955
AK039696	4658	AK039696	-0,913	0,014	0,4986
NM_023066	2684	Asph	-0,992	0,006	0,4996
AK045798	1566	AK045798	-1,117	0,000	0,5014
AK010831	3719	2410187C16Rik	-1,044	0,003	0,5027
NM_177312	4328	6330408A02Rik	-0,952	0,006	0,5076
AK015257	3520	4930430M16Rik	-1,250	0,000	0,5103
AK051846	446	AK051846	-1,589	0,000	0,5113
NM_029466	3870	Arl8	-1,107	0,000	0,5130
NM_173744	2533	2610019F03Rik	-1,321	0,000	0,5221
AK079279	2907	AK079279	-1,039	0,003	0,5289
AK006546	4674	1700030G11Rik	-0,891	0,014	0,5317
AK079839	725	AK079839	-1,289	0,000	0,5318
NM_172919	3631	2210010B09Rik	-0,924	0,014	0,5354
NM_008662	1717	Myo6	-0,897	0,014	0,5389
BC042780	3453	2010110O04Rik	-1,102	0,000	0,5419
NM_020514	2359	Olf1509	-0,924	0,014	0,5442
NM_010498	3225	Ids	-0,913	0,014	0,5443
NM_178081	4518	2210010L05Rik	-0,951	0,006	0,5454
NM_054068	1806	Vsx1	-1,013	0,003	0,5495
AB093219	2244	BC032203	-0,927	0,014	0,5537
NM_031158	2784	Ank1	-1,104	0,000	0,5545
AK017306	2637	5430414B12Rik	-1,070	0,000	0,5592
AK016695	3226	4933406J08Rik	-0,918	0,014	0,5597
NM_018754	2053	Sfn	-0,937	0,014	0,5727
AK089126	2666	AK089126	-0,889	0,014	0,5789

Name	Original row	GeneName	Score (d)	q-value (%)	Ratio CXCR5+PP vs CXCR5+LN
AK081112	3271	Usp2	-1,046	0,003	0,5856
AK087105	114	AK087105	-1,049	0,003	0,5889
NM_019445	2151	Fmn2	-1,008	0,003	0,5958
AK048296	3105	AK048296	-0,898	0,014	0,5980
NM_001001798	3852	Atp11c	-0,892	0,014	0,6017
NM_011564	2724	Sry	-0,910	0,014	0,6140
NM_009296	3430	Supt4h	-1,182	0,000	0,6219
NM_021455	2566	Wbscr14	-0,924	0,014	0,6242
AK082682	1949	AK082682	-0,974	0,006	0,6256
BC013893	2635	Masp2	-1,068	0,000	0,6426
AK087943	3971	AK087943	-0,916	0,014	0,6525
NM_183305	3266	A430057O09	-0,941	0,014	0,6646
AK050039	3382	Zranb3	-0,942	0,014	0,6716
AK009567	3926	2310032F03Rik	-1,069	0,000	0,6767
NM_173408	2227	BC030335	-0,898	0,014	0,6842
AK053612	2848	Xrcc4	-0,943	0,014	0,7188
NM_146906	2461	Olfir853	-1,061	0,003	0,7394
BC059025	2975	2810011L19Rik	-0,952	0,006	0,8249

Danksagung

Hiermit möchte ich ganz herzlich Herrn Professor Dr. Reinhold Förster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die persönliche Betreuung der Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Lars Ohl für die nette wissenschaftliche Betreuung und insbesondere die geduldige Einarbeitung in die Arbeit mit Mäusen.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Abteilung Immunologie von Prof. Förster für die Unterstützung meiner Arbeit und das nette Arbeitsklima.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Eva Stüwe für die Unterstützung bei einigen Versuchen und bei Herrn Dr. Ulrich Wulbrandt für die Durchführung des Mikroarrays.

Elke Blissenbach möchte ich danken für ihren unendlichen Einsatz bei allen organisatorischen aber auch privaten Problemen der letzten drei Jahre.

Und schließlich möchte ich mich bei meiner Familie, Jessica und Steffi und ganz besonders bei Matthias für die Unterstützung, Geduld, offenen Ohren und den Zuspruch bedanken.