HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

Funktion des Chemokins CCL17 bei allergischen Immunreaktionen der Haut

Inaugural-Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Susanne Stutte

aus Stralsund

Düsseldorf, Mai 2009

aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Irmgard Förster

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

FUNKTION DES CHEMOKINS CCL17 BEI ALLERGISCHEN IMMUNREAKTIONEN DER HAUT 1

1 EINLEITUNG 9

1.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM 9

1.1.1 Dendritische Zellen 10

1.1.2 Aufnahme und Prozessierung von Antigenen 11

1.2 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM 12

1.2.1 Antigenrezeptorrepertoir 13

1.2.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex 14

1.2.3 Die humorale Immunantwort 15

1.3 ALLERGIEN 16

1.3.1 Typ IV (verzögerter Typ; delayed type hypersensitivity DTH): 18

1.3.1.1 Haptene 18

1.3.1.2 Experimentelle Forschung 19

1.3.1.3 Kontakthypersensitivitätsreaktionen 19

1.3.2 Funktion der Keratinozyten bei allergischen Reaktionen 20

1.4 LANGERHANS ZELLEN UND DERMALE DC 21

1.4.1 Funktion von LZ 23

1.4.2 Rolle der LZ bei CHS Reaktionen 24

1.4.3 Die Wanderung von Dendritischen Zellen ist von Chemokinen gesteuert 25

1.5 ATOPISCHE DERMATITIS 28

1.6 DAS CHEMOKIN CCL17 UND SEINE BEDEUTUNG IM IMMUNSYSTEM 31

1.7 ZIELSETZUNG 33

2 MATERIAL UND METHODEN 35

2.1 MATERIAL 35

2.1.1 Geräte 35

2.1.2 Verbrauchsmaterial 35

2.1.3 Stammlösung oder Puffer 36

2.1.4 Chemikalien und Enzyme 37

2.1.5 Medien ... *38*
2.1.6 Verwendete Antikörper ... *39*
2.1.7 Software ... *40*
2.1.8 Versuchstiere ... *40*
2.2 METHODEN ... 42
2.2.1 Zellzahlbestimmung durch Trypanblau-Vital-Färbung ... *42*
2.2.2 Isolierung von Zellen aus der Haut ... *42*
2.2.3 Isolierung von Zellen aus Lymphknoten ... *43*
2.2.4 Anreicherung mit einem Dichtegradienten ... *43*
2.2.5 Generierung dendritischer Zellen aus Knochenmark ... *43*
2.2.6 Durchflusszytometrie ... *44*
2.2.7 Intrazelluläre Färbung: ... *45*
2.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ... *45*
2.2.8.1 Gesamt-IgE-ELISA: ... 45
2.2.8.2 OVA-spezifisches IgG1 bzw. IgG2a: ... 46
2.2.9 Anfertigen von Gefrierschnitten ... *47*
2.2.10 Histologie ... *47*
2.2.11 Immunfluoreszenz ... *48*
2.2.12 Haptenapplikation ... *48*
2.2.13 Mausmodell für Atopische Dermatitis (AD) ... *49*
2.2.14 Blutabnahme und Serumgewinnung ... *49*
2.2.15 In vitro Experimente zur Untersuchung der Wanderungsfähigkeit von DC ... *50*
2.2.15.1 Transwell-Migrationstest ... 50
2.2.15.2 3D Kollagengel Chemotaxis-Messung ... 50
2.2.16 T-PCR ... *51*
2.2.17 Statistik ... *51*
3 ERGEBNISSE ... 52
3.1 DIE EXPRESSIONSSTÄRKE VON CD24A UNTERSCHEIDET LZ VON DDC ... 52
3.1.1 Abbau des CD11c Epitops durch Enzyme ... *52*
3.1.2 Bei epidermalen LZ korreliert die CD24a Expression mit der von Langerin ... *54*
3.1.3 Die CD24a Expression unterscheidet LZ von dDC im hdLK ... *55*
3.1.4 Wanderungskinetik von CD24a-hoch experimentierenden DC, die in den LK einwandern ... *59*
3.1.5 CD103 Expression und CD24a ... *59*
3.1.6 CD24a Expression bei den aus CD8□+ DC im LK ... *62*
3.1.7 LZ und dDC exprimieren hohe Level an CD40 ... *63*

3.2 DAS CHEMOKIN CCL17 IST IN DER HAUT INDUZIERBAR 65
3.3 CCL17 IN ATOPISCHER DERMATITIS 66
3.3.1 AD Behandlung induziert die Expression von CCL17 in der Haut 66
3.3.2 Normale Entwicklung von Akanthose, aber reduzierte dermale Entzündung in CCL17-defizienten Mäusen 68
3.3.3 Durch CCL17 wird die allergen-spezifische humorale Immunantwort verstärkt 72
3.3.4 CCL17 verstärkt die Th1- und Th2-Zytokinproduktion in der läsionalen Haut 74
3.3.5 Die Abwesenheit von CCL17 führt zur verminderten Effekto- T-Zellbildung im hdLK 75
3.3.6 Gestörte Wanderung der DC in den hdLK und der läsionalen Haut in CCL17-defizienten Mäusen 78
3.3.7 Die durch ein Hapten induzierte Auswanderung der LZ benötigt CCL17 82
3.3.8 Die Migration der DC in Richtung CCR7 Liganden ist abhängig von CCL17 83
3.3.9 CCL17 reguliert die CCR7 Funktion ohne die CCR7 Expression zu verändern 86
4 DISKUSSION 89
4.1 DIE EXPRESSIONSSTÄRKE VON CD24A UNTERSCHEIDET LZ VON DDC 89
4.1.1 CD24a ist ein geeigneter Marker für LZ und dDC 89
4.1.2 Wanderungskinetik von CD24a exprimierenden LZ und dDC 91
4.1.3 Funktion von CD24a 92
4.2 CCL17 IN ALLERGISCHEN IMMUNREAKTIONEN DER HAUT 93
4.2.1 Funktion von CCL17 bei der Pathogenese von AD 93
4.2.2 CCL17 vermittelt die effiziente Wanderung von DC auf CCR7-Liganden 95
4.2.3 Mechanismus der Wirkungsweise von CCL17 96
4.2.4 CCL17 und CCL22 98
4.2.5 CCL17 und TSLP 99
4.2.6 Ausblick 100
5 REFERENZEN 102
6 ZUSAMMENFASSUNG 110
7 SUMMARY 111
8 DANKSAGUNG 112
9 ANHANG 113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Subtypen der DC Populationen in der Haut. 22
Abbildung 2: Zwei-Schritt-Modell der LZ Wanderung zum drainierenden LK in Abhängigkeit von CXCR4 und CCR7. 27
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Mausmodells der Atopischen Dermatitis. 29
Abbildung 4: Die Inkubation mit Trypsin und Kollagenase P führt zum Abbau des CD11c Epitops. 53
Abbildung: 5 CD24a Expression in der Haut 54
Abbildung 6: CD24a Expression von DC der Haut im drainierenden LK (hdLK). 58
Abbildung 7: Expression von CD103 und CD24a in der Haut 60
Abbildung 8:CD103 und CD24a Färbemuster im hdLK. 61
Abbildung 9: CD24a Expression bei blood derived CD8□+ DC 62
Abbildung 10: Vergleich der CD40/CD11c Expression mit der Langerin/CD24a Färbung 64
Abbildung 11: Die Expression von CCL17 ist durch die Applikation eines Haptens induzierbar. 65
Abbildung 12: Heraufregulierung von CCL17 im AD Mausmodell. 67
Abbildung 13: Entstehung einer Akanthose und einer dermalen Entzündung im AD Modell. 70
Abbildung 14: Quantifizierung der CD4+ T Zellen und der FcεRI+ Zellen in der behandelten Haut. 71
Abbildung 15: Die antigen-spezifische humorale Immunantwort ist in Abwesenheit von CCL17 reduziert. 73
Abbildung 16: mRNA Expression von Zytokinen in der behandelten Haut 75
Abbildung 17: Quantifizierung der Effektor-T-Zellen im hdLK 77
Abbildung 18: Anzahl der DC in den Haut-drainierenden LK (hdLK). 79
Abbildung 19: Verminderte Auswanderung von DC aus der läsionalen Haut in Abwesenheit von CCL17 80
Abbildung 20: Quantitative Auswertung der CD11c und MHCII Färbung der Haut. 81
Abbildung 21: CCL17 wird für die Auswanderung der DC aus der Haut nach Sensibilisierung benötigt. 83
Abbildung 22: DC besitzen in Abwesenheit von CCL17 nur eine eingeschränkte Fähigkeit in Richtung von CCR7 Liganden zu Wandern. 86
Abbildung 23: Einfluss von CCL17 auf die CCR7 und CCR4 Expression bei DC. 88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
AK	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
CHS	Kontakthypersensitivitäts Immunantworten
DC	dendritische Zelle
dDC	dermale dendritische Zelle
DNFB	2,4- Dinitro-1-Fluorobenzen
DT	Diphterie Toxin
EGFP	enhanced green fluorescent protein
engl.	Englisch
FACS	(fluorescence activated cell sorting) Flow Cytometer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	gram
g	Gravitationskraft
GM-CSF	granulocyte-macrophage stimulating factor
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin & Eosin
hdLK	Haut drainierender Lymphknoten
IL-	Interleukin
LK	Lymphknoten
LZ	Langerhans Zelle
M	Molar
MHC	Major Histokompatibility Complex
min	Minute

OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin (Protein vom Huhn)
PAMPS	Pathogen associated molecular pattern, konservierte Strukturen der Erreger
PBS	Phosphate buffered Saline
pDC	plasmazytoide DC
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PRRs	pattern recognition receptors, spezifischen Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean, *Standard* Fehler des Mittelwertes
Th	T Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Als das Immunsystem (lat. immunis bedeutet im weitesten Sinn: unberührt, frei) wird das Abwehrsystem von Tieren, Pflanzen oder Menschen gegen fremde, pathogene oder karzinogene Stoffe bezeichnet. Schon einfache Organismen besitzen einen Abwehrmechanismus, das sogenannte angeborene Immunsystem. Es entstand sehr früh in der Entwicklung der Lebewesen und wurde seitdem weitgehend unverändert beibehalten. Es erkennt konservierte Strukturen der Erreger, sogenannte PAMPS (engl. Pathogen associated molecular pattern) mit spezifischen Rezeptoren, den PRRs (engl. pattern recognition receptors, PRR). Im Laufe der Phylogenese von Wirbeltieren entwickelte sich aus dem angeborenen Immunsystem eine zusätzliche komplexe und adaptive Immunabwehr. Viele Pathogene können erfolgreich vom angeborenen Immunsystem bekämpft werden, so dass es nicht zu einem Ausbruch einer Krankheit kommt. Andere Erreger hingegen, die von der angeborenen Immunität nicht beseitigt werden können, aktivieren das adaptive Immunsystem.

Sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem basieren auf Reaktionen von weißen Blutzellen, den Leukozyten. Diese entwickeln sich im Knochenmark aus den Stammzellen zu den beiden Hauptgruppen der weißen Blutzellen – die myeloiden und die lymphatischen Vorläuferzellen und überwachen anschließend die peripheren Gewebe, indem sie im Blut und in einem besonderen Gefäßsystem, dem lymphatischen System, zirkulieren. Zu den myeloiden Zellen zählen die Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DC) und die Mastzellen. Sie kommen in vielen Körpergeweben vor und gehören meist zu den Ersten, die eindringende Pathogene erkennen. Die Makrophagen nehmen Infektionserreger durch Phagozytose ins Phagosom auf, wo diese nach der Fusion des Phagosoms mit den Lysosomen abgetötet und verdaut werden. Zudem sezernieren Makrophagen toxische Substanzen zur Eindämmung der Ausbreitung von Erregern, sowie Botenstoffe (Zytokine). Diese induzieren eine Immunantwort, indem sie andere Zellen

aktivieren. Bei den Granulozyten lassen sich aufgrund ihres Färbeverhaltens im Blutausstrich drei kurzlebige Zelltypen unterscheiden, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Während die Zellen im gesunden Gewebe kaum anzutreffen sind, werden sie bei Infektionen im Knochenmark vermehrt gebildet und in großer Anzahl an den Entzündungsherd rekrutiert. Sie nehmen die Erreger in intrazelluläre Vesikel, den Phagosomen, auf oder töten sie durch Sekretion von Enzymen und antimikrobiellen Peptiden ab. Die Mastzellen mit ihren dichten Granula befinden sich nur in Geweben, hauptsächlich den Schleimhäuten und in der Haut. Wenn sie die Infektionserreger erkennen oder andere Aktivierungsreize erhalten, setzen sie innerhalb von Sekunden Histamin, TNF□, IL-4 und IL-1ß frei und rekrutieren andere Zellen an den Entzündungsherd.

1.1.1 Dendritische Zellen

Zeitlich parallel zu den oben beschriebenen Vorgängen nehmen dendritische Zellen (engl. dendritic cell, DC)als Teil des angeborenen Immunsystems eine Brückenfunktion zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem ein. Unreife DC befinden sich überall im Organismus, sind aber vor allem an den Grenzschichten, wie der Haut, im Darm und in der Lunge, anzutreffen. Als unreife Zellen nehmen sie in der Peripherie ständig Antigene durch Phago- und Pinozytose auf, um dann in den drainierenden Lymphknoten (LK) einzuwandern. Unter homeostatischsen Bedingungen präsentieren sie dort Antigene, um eine Toleranz gegen „Selbst“ und harmlose Antigene zu induzieren [Steinman and Banchereau, 2007]. Werden die DC aber durch entzündliche Mediatoren aktiviert, so reifen sie und sind nun in der Lage nach der Wanderung zum LK naïve T-Zellen zu aktivieren und die Bildung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, und damit die adaptive Immunantwort zu vermitteln [Probst et al., 2003; Steinman and Nussenzweig, 2002]. Daher gehören DC, wie auch B-Zellen und Makrophagen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC).

Die essentielle Bedeutung von DC im Immunsystem wurde erst 1973 deutlich, als Steinman und Cohn [Steinman and Cohn, 1973] DC der Milz als potente Stimulatoren einer

Immunantwort beschrieben. DC liegen aber nur in geringer Anzahl im Gewebe vor und es fehlten geeignete Marker, um DC zu erkennen und von Monozyten und Makrophagen zu unterscheiden. Zusätzlich gab es keine Methoden, um DC zu isolieren und anzureichern. Dies führte zunächst nur zu einem langsamen Fortschritt bei der Erforschung dieser Zellen. Erst in den 1990ern gelang die Entwicklung von Methoden, um DC zu isolieren oder aus Knochenmarkstammzellen abzuleiten [Caux et al., 1992; Inaba et al., 1992; Sallusto and Lanzavecchia, 1994]. Heute weiß man, dass DC aus vielen Subpopulationen bestehen, die sich aufgrund ihrer immunologischen Funktion, der Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Markern, sowie ihren anatomischen Ursprüngen unterscheiden. In Mäusen exprimieren alle konventionellen DC unterschiedliche Mengen an CD11c (alphaX-Integrin) und MHC Klasse II (MHCII) Moleküle. Weitere Unterscheidungsmarker sind CD8□, CD4, CD11b, CD103 und Langerin, wobei die Liste der Marker kontinuierlich zunimmt [Segura and Villadangos, 2009; Shortman and Naik, 2007].

1.1.2 Aufnahme und Prozessierung von Antigenen

DC sind auf Aufnahme, Transport, Prozessierung und Präsentation von Antigenen spezialisiert. Sie nehmen Antigene aus dem peripheren nicht-lymphatischen Gewebe auf, prozessieren diese und wandern zu den lymphatischen Organen, um naïven T-Zellen die Fremdpeptide zu präsentieren.

Unreife dendritische Zellen können mit verschiedenen Mechanismen Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen: die Makropinozytose erlaubt den Zellen eine kontinuierliche, nichtselektive Aufnahme großer Mengen an Flüssigkeit. Mit Hilfe der Phagozytose und der Rezeptor-vermittelten Endozytose werden apoptotische und nekrotische Zellfragmente, Viren, Bakterien bzw. Immunkomplexe oder opsonierte Partikel internalisiert [Albert et al., 1998; Sallusto et al., 1995]. Zusätzlich, wie die andere Zellen des angeborenen Immunsystems auch, erkennen DC pathogene Organismen durch PRRs [Medzhitov and Janeway, 1998]. Nach Internalisierung der Antigene in Endosomen erfolgt deren

Prozessierung mit Hilfe von Proteasen zu Peptiden mit einer Länge zwischen 15 und 24 Aminosäuren. Diese werden dann in den reifen DC in MHCII-reiche Kompartimente transportiert, auf MHCII Moleküle geladen und unter Beteiligung des Membran-Glykoproteins DC-LAMP [de Saint-Vis et al., 1998] an die Zelloberfläche transportiert. Dieser Peptid-MHC-II-Komplex bleibt in reifen DC über Tage hinweg stabil und das Peptid kann somit effektiv den CD4+ T-Zellen präsentiert werden. Intrazelluläre Antigene werden von zytosolischen Proteasomen zu Peptiden mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren degradiert, im Endoplasmatischen Retikulum auf neu synthetisierte MHCI Moleküle geladen und CD8+ T-Zellen präsentiert. Dendritische Zellen können phagozytierte Antigene auch über MHCI Moleküle den CD8+ T-Zellen präsentieren. Dies geschieht, um eine Immunantwort gegen Erreger zu initiieren, die DC selbst nicht infiziert haben, dennoch aber eine MHCI vermittelte Immunantwort benötigen. Dieser essentielle Vorgang wird als *'cross-presentation'* bezeichnet [Segura and Villadangos, 2009].

1.2 Das Adaptive Immunsystem

Die Zellen der adaptiven Immunabwehr, entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen und differenzieren zu B- und T-Zellen. Sie sind in der Lage, spezifische Strukturen (Antigene) der Pathogene zu erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen und Antikörper zu bilden. Allerdings kann bei der adaptiven Immunantwort das Antigen alleine naïve T- und B-Zellen nicht aktivieren. APC nehmen Antigene auf und präsentieren diese den T-Zellen. Naïve T-Zellen benötigen zusätzlich noch costimulierende Signale von den APC. Die DC sind dabei die stärksten T-Zell-Aktivatoren. Naïve B-Zellen erhalten ihre zusätzlichen Signale von den T-Helfer(Th)-Zellen. Die Th-Zellen gewährleisten die zellvermittelte Immunantwort und steuern B-Zellen in ihrer Funktion, während diese für die Antikörper vermittelte (humorale) Immunantwort verantwortlich sind.

1.2.1 Antigenrezeptorrepertoire

Durch Antigenrezeptoren sind die Lymphozyten (T- und B-Zellen) in der Lage die Anwesenheit von Antigenen in ihrer Umgebung zu detektieren. Die spezifischen Rezeptoren kommen bei B-Zellen in Form von Immunglobulinen und bei T-Zellen als T-Zell-Rezeptoren vor. Das große Spektrum von Antigenspezifitäten innerhalb des Antigenrezeptorrepertoires ist durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Antigenbindungsstelle bedingt, die von den variablen (V-) Regionen der Rezeptorproteinketten gebildet werden. In jeder Kette ist die variable Region mit einer unveränderten konstanten (C-) Region verknüpft, welche die Effektorfunktion bei Antikörpern und die Signalfunktion bei T-Zellen übernimmt.
Die variablen Regionen sind in mehreren Stücken kodiert, den sogenannten Gensegmenten. Diese werden im sich entwickelnden Lymphozyten durch somatische DNA-Rekombination zu einer kompletten V-Region-Sequenz zusammengebaut. Diesen Mechanismus bezeichnet man als Genumlagerung. Die Auswahl der Gensegmente geschieht zufällig, und die große Zahl möglicher verschiedener Kombinationen sorgt für die Diversität des Rezeptor-repertoires.
In B-Zellen nicht aber in T-Zellen werden die variablen Regionen in einem weiteren Prozess zusätzlich modifiziert, welchen man als somatische Hypermutation bezeichnet. Dies geschieht, nachdem B-Zellen auf ein Antigen getroffen und aktiviert worden sind. In den variablen Regionen der zusammengebauten Immunglobuline erfolgt dann eine große Zahl von Punktmutationen, die eine zusätzliche Vielfalt innerhalb des wachsenden Klons von B-Zellen erzeugen. Durch Selektion werden diejenigen Zellen ausgewählt, welche das Antigen am Besten binden und es somit am effektivsten bekämpfen können. Die übrigen Zellen gehen zugrunde. Dieser Prozess, welcher in den Proliferationszentren (Keimzentren) der sekundären lymphatischen Organe, wie Milz und Lymphknoten (LK) stattfindet, ermöglicht es dem Organismus, eine Vielzahl von verschiedenen Antikörpern zu produzieren, sich somit an einwirkende Pathogene anzupassen, sowie die Affinität der Antikörper zum Antigen zu erhöhen.

1.2.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) liegt beim Menschen auf Chromosom 6 und bei Mäusen auf Chromosom 17. Er erstreckt sich über einen DNA Bereich von ungefähr vier Centimorgan oder $4x10^6$ Basenpaaren. Beim Menschen enthält er über 200 Gene. Die Gene welche die □ Ketten der MHC Klasse I Moleküle (MHC-I) und die □ und β Ketten von MHC-Klasse-II Molekülen (MHC-II) codieren, sind in diesem Komplex gekoppelt. Die Gene für das β2 Mikroglobulin und für invariante Kette liegen auf anderen Chromosomen. Die Produkte einzelner MHC Allele können sich bis zu 20 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Die meisten dieser Unterschiede liegen auf exponierten Oberflächen der äußeren Domäne des Moleküls, vor allem aber in der peptidbindenden Furche. Die polymorphen Reste, die sie auskleiden, bestimmen die peptidbindenden Eigenschaften der einzelnen MHC Moleküle.
Der T-Zellrezeptor (TCR) besteht aus verschiedenen Untereinheiten. Diese bilden ein Heterodimer, welches sich aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten, entweder α/β oder γ/δ, zusammensetzt. Das α/β- oder γ/δ-Heterodimer ist in der Zellmembran einer T-Zelle verankert und dort mit dem dicht benachbarten CD3-Komplex assoziiert, der für die Signalübermittlung an das Zellinnere unentbehrlich ist. Im Gegensatz zu den Immunglobulinen der B-Zellen bleiben die TCR-Moleküle mit ihrem transmembranösen Anteil in der Lymphozytenmembran verankert und können nicht sezerniert werden. Unter physiologischen Bedingungen erkennt der α/β-TCR das Fremdantigen an der Oberfläche nur in Zusammenhang mit dem körpereigenen MHC. Diese Besonderheit der Antigenerkennung durch T-Zellen ist als “MHC-Restriktion” bzw. als “Zinkernagel-Doherty-Phänomen” bekannt [Zinkernagel and Doherty, 1979]. In dieser Hinsicht lassen sich zwei T-Zell-Subpopulationen unterscheiden. Die CD4+ Th-Zellen erkennen ein Antigen nur dann, wenn MHC-II Moleküle auf der Oberfläche von APC exprimiert werden. Das CD4-Molekül stabilisiert den TCR/MHC-II/Fremdantigen-Komplex. Die CD8+ zytotoxische T-Zellen binden Antigene bevorzugt in Assoziation mit MHC-I Molekülen. Hier hat das CD8-Molekül die Funktion, die Bindung zum MHC-I Molekül zu stabilisieren, während der antigenspezifische TCR sowohl das Antigen als auch das MHC-Molekül bindet. Die Spezifität eines TCR wird demnach vom Peptid als auch vom MHC-

Molekül bestimmt, an welches das Peptid gebunden ist. Nicht alle TCR, die bei der Genumordnung entstehen, können körpereigene MHCI Moleküle erkennen und bei Reaktionen auf Fremdantigene mitwirken. Diejenigen die dazu in der Lage sind, werden durch positive Selektion im Thymus ausgewählt und überleben. Die meisten körpereigenen Proteine werden im Thymus von den Stromazellen und den DC präsentiert. Wenn der TCR einer sich entwickelnden T-Zelle im Thymus stark an ein Antigen bindet, welches von den Stromazellen oder DC im Thymus präsentiert wird, so stirbt sie einen programmierten Zelltod (Apoptose). Dieser Prozess wird negative Selektion genannt und verhindert, dass eine T-Zelle auf körpereigene Peptide reagiert und Autoimmunkrankheiten entstehen.

1.2.3 Die humorale Immunantwort

Die Zellzwischenräume im Körper werden durch die humorale Immunantwort geschützt. Dies bedeutet, es werden Antikörper (AK) von B-Zellen gebildet, die extrazelluläre Mikroorganismen zerstören und so verhindern, dass sich intrazelluläre Infektionen ausbreiten.

Die AK tragen mit drei Mechanismen zur Immunität bei: Viren und Bakterien binden an die Oberfläche von Zellen, um in diese einzudringen. AK die sich an das Pathogen anlagern, können diese Bindung verhindern und werden daher als neutralisierende AK bezeichnet. Auch bakterielle Toxine können von AK neutralisiert werden. Andere Arten von Bakterien vermehren sich außerhalb der Zelle. AK können die Aufnahme der Erreger in Phagozyten erleichtern, indem sie an den Erreger binden und diesen beschichten. Der Fc-Teil der AK wird von phagozytierenden Zellen erkannt und vermittelt die Aufnahme des Erregers. Dies bezeichnet mal als Opsonisierung. Weiterhin können AK die auf der Oberfläche eines Erregers gebunden sind, die Proteine des Komplementsystems aktivieren. Zusätzliche Phagozyten werden angelockt und die Erreger gleichzeitig durch Porenbildung in ihrer Membran lysiert. Welcher Effektormechanismus zum Einsatz kommt, entscheiden aber die Isotypen der C-Region der AK.

Durch einen Isoytp- oder Klassenwechsel kann eine bestimmte variable (V-) Domäne mit der konstanten Region eines beliebigen Isotyps assoziiert werden. Die DNA Umordnungen, die dem Isotypenwechsel zugrunde liegen und der humoralen Immunantwort vielfältige Funktionen verleihen, werden von Zytokinen gesteuert. Besonders von denjenigen, die von aktivierten CD4+ Effektor-T-Zellen sezerniert werden. Die Zytokine stimulieren die Bildung und Spleißen von mRNA, welche von sogenannten Rekombinationsstellen transkribiert wird. Diese Rekombinationsstellen liegen 5‘ vor jedem Gen für die konstanten Regionen. Das Zytokin IL-4 induziert bei der Maus überwiegend den Wechsel zu IgG1 und IgE, während der transformierende Wachstumsfaktor TGF-ß einen Wechsel zu IgG2a und IgA hervorruft. Diese beiden Zytokine werden von Th2-Zellen gebildet. Th1-Zellen sind nicht in der Lage Antikörperreaktionen auszulösen. Sie nehmen jedoch am Isotypenwechsel teil, indem IFN-γ den Wechsel zu IgG2a und IgG3 induziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die B-Zellen in den Keimzentren eine Reihe wichtiger Modifikationen durchlaufen: Dazu gehören eine somatische Hypermutation, durch die sich die variablen Regionen der B-Zellen verändern, eine Affinitätsreifung, bei der B-Zellen mit hoher Affinität für das Antigen selektiert werden, sowie der Isotypenwechsel. Die aktivierten B-Zellen differenzieren später weiter zu B-Gedächtniszellen und Plasmazellen. Nach einer Infektion bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, um bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger binnen kurzer Zeit eine angemessene Abwehrreaktion zu ermöglichen. Es besteht eine langanhaltende Immunität.

1.3 Allergien

Der Begriff *Allergie* wurde 1906 von Freiherr Clemens von Pirquet, einem Wiener Kinderarzt, in der Hinsicht geprägt, dass.. „der *en-érgeia*, einer körpereigenen (inneren) Kraft, eine *all-érgeia* als Ausdruck von Reaktionen auf körperfremde Stoffe gegenübertrete“.. Heute beschreibt der Begriff Allergie Überempfindlichkeitsreaktionen, die durch eine Immunantwort gegen ansonsten harmlose Antigene ausgelöst werden.

In der Regel haben körperfremde Moleküle (Antigene) ein hohes Potential eine Immunantwort auszulösen, wenn sie ein Molekulargewicht größer als 2500Da besitzen und ihre Struktur große Unterschiede zu körpereigenen Strukturen aufweist. Beispiele für Antigene sind Pollen, Bakterien, Viren und Pilze. Proteinantigene sind wesentlich immunogener als Zuckerstrukturen und Lipide. Zudem spielt die Dosis eine entscheidende Rolle. Ist sie zu niedrig oder zu hoch werden keine Effektorfunktionen in Gang gesetzt, sondern im Gegenteil, während der stattfindenden Immunantwort wird eine Toleranz gegenüber dem Antigen erzeugt. Das Potential der Sensibilisierung einer chemischen Substanz hängt von dessen chemischen Reaktivität und Fähigkeit ab, an Proteine zu binden. Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 2500Da können selbst keine Immunantwort auslösen und werden Haptene genannt.

Nach Coombs und Gell werden die Überempfindlichkeitsreaktionen in vier Typen eingeteilt:

Typ I (Soforttyp): Allergien vom Soforttyp treten auf, wenn ein Organismus, nach Kontakt mit einem harmlosen Allergen, IgE-Antikörper produziert. Eine weitere Exposition des Allergens führt dazu, dass Strukturen seiner Proteine von den bereits vorhandenen Antikörpern erkannt und gebunden werden. Die hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen können durch IgE-gebundene Allergene quervernetzt werden, wodurch diese ihr Histamin und TNF□ aus den Granula freisetzen. Dies führt zu akuten Entzündungsreaktionen.

Typ II: In seltenen Fällen ist es möglich, eine Allergie gegen bestimmte Medikamente zu entwickeln. Das Antibiotikum Penicillin zum Beispiel, kann die Zelloberfläche von Blutzellen binden, wodurch diese plötzlich selbst ein Ziel von Antikörpern darstellen. Führt die Bindung von IgG an den Fcγ-Rezeptor von Makrophagen oder NK-Zellen zu einer Quervernetzung, wird eine Antikörper-vermittelte Zellzytotoxizität (ADCC) hervorgerufen.

Typ III: Unzureichend metabolisierte, lösliche Allergene können in großen Mengen Immunkomplexe bilden und zu systemischen Krankheiten führen. Ein Beispiel ist die Serumkrankheit. Hier werden Antikörper gegen tierisches Antiserum gebildet, welches z.B. während der Anwendung von Gegengiften verabreicht wurde. Diese Antikörper aktivieren die Phagozyten und das Komplementsystem. Es bilden sich Immunkomplexe, die von den Phagozyten beseitigt werden.

1.3.1 Typ IV (verzögerter Typ; delayed type hypersensitivity DTH):

Die DTH ist eine Antigen-spezifische, überwiegend Th1-vermittelte Immunreaktion auf ein subkutan appliziertes Antigen. Die DTH entwickelt sich in zwei Phasen, der Sensibilisierungsphase und der Effektorphase.

1.3.1.1 Haptene

Abgesehen von einigen Metallsalzen sind natürlich vorkommende Haptene organische Verbindungen. Sie besitzen elektrophile Eigenschaften und reagieren daher mit den elektronenreichen Seitengruppen von Proteinen. Die bevorzugten Zielstrukturen sind dabei Lysin-, Cystein- und Histidinreste. Während die Kopplung organischer Haptene in Form einer nukleophilen Substitution oder Addition zu stabilen kovalenten Bindungen führt, bilden Metallsalze reversibel Komplexe mit den Proteinen.

Die Haptene, welche eine allergische Reaktion hervorrufen können, werden auch Allergene bezeichnet. Sie binden an körpereigene oder an membrangebundene Proteine. Auch die Bindung an bereits gebundene Peptide in den Bindungsgruben der MHCII Moleküle ist denkbar und konnte bereits durch *in vitro* Experimenten belegt werden [Kalish et al., 1994]. Wenn die Kopplung an Proteine erfolgt, so müssen diese entweder aus dem Exrazellularraum oder der Zellmembran in die Prozessierungskompartimente endozytiert bzw. aus dem Zytoplasma in solche transportiert werden. Es entstehen Peptid-Hapten-Komplexe, die je nach ihrem Entstehungsweg in die Bindungsgrube von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle passen und damit CD4+ und CD8+ T-Zellen präsentiert werden können.

Während zu den wichtigsten Metallsalzen Nickel- und Kobaltsalze gehören, machen die Pflanzen den größten Anteil an natürlichen Allergenen aus. In Europa zählen die Sesquiterpenlactone (Sekundärmetabolit der Korbblütler) zu den häufigsten Allergenen, in Nordamerika ist es das Urushiol in Toxicodendron Arten (z.B. Poison Ivy).

1.3.1.2 Experimentelle Forschung

Für die Generierung geeigneter Therapeutika ist das Verstehen der Hapten-vermittelten Immunreaktionen essentiell. Man bedient sich oft synthetisch hergestellten Haptenen und Hapten-derivaten. Für die Untersuchung der Nickelallergie verwendet man $NiCl_2$. Um die Vorgänge zu verstehen, die Urishiol auslöst und welche sich in einem starken Kontaktekzem manifestieren, wird DNFB (2,4- Dinitro-1-Fluorobenzen) benutzt.

Fluorescein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit blauem Licht (Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 496 nm, z.B. durch einen Argon-Ionen-Laser) grünes Licht (Wellenlänge ca. 520 bis 530 nm) abgibt. Verwandte Reaktivfarbstoffe wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) können mit verschiedenen Antikörpern (Immunglobulinen) gekoppelt werden und so für die Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie eingesetzt werden. FITC wirkt aber auch als ein Hapten und wird daher oft als solches in der experimentellen Forschung eingesetzt. Durch seine fluoreszierenden Eigenschaften markiert es die Zellen, an die es gebunden hat.

1.3.1.3 Kontakthypersensitivitätsreaktionen

Ein Spezialfall ist der DTH Immunreaktion, ist die Kontakthypersensitivitätsreaktion (engl. *contact hypersensitivity reaction, CHS*), bei welcher die Antigene oberflächlich durch die Haut aufgenommen werden. Auch Haptene können über die Haut aufgenommen werden, indem sie in die Epidermis penetrieren. Sie werden dort von LZ durch Phagozytose aufgenommen oder direkt in den peptidbindenden Gruben der MHCI- und MHCII-Moleküle der LZ gebunden und präsentiert. Die LZ reifen und wandern in den hdLK, wo sie das Hapten naïven T-Zellen präsentieren. Wenn eine naïve T-Zelle mit dem passenden Rezeptor das Antigen (Hapten+Protein) erkennen kann, erfolgt die klonale Proliferation und Entstehung von allergen-spezifischen $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. Über den Blut- und Lymphkreislauf gelangen diese Zellen in den ganzen Körper und lagern sich auf Grund ihrer gewebsspezifischen Adhäsionsmoleküle präferentiell in der Region der Sensibilisierung an. Die Sensibilisierungsphase kann je nach Substanz einige Tage oder sogar Jahre dauern. Im Allgemeinen dauert der Aufbau des immunologischen Gedächtnisses beim

Menschen aber 8-14 Tage, bei der Maus 5-10 Tage. Ein erneuter Kontakt des bereits sensibilisierten Individuums mit dem Hapten führt zur Effektorphase der DTH, wobei der Ort der Reizung unabhängig von der Sensibilisierungsstelle ist. Bereits einige Stunden nach der Exposition kommt es zu einer akuten Immunreaktion, die durch Allergen-spezifische Geächtnis-T-Zellen vermittelt wird. Nach der Allergenpräsentation durch Makrophagen und DC werden die T-Zellen zur Proliferation und zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine (IFN-γ, IL-1, IL-2) stimuliert. Es werden weitere Zellen rekrutiert, die wiederum Mediatoren freisetzen. Es kommt zu Flüssigkeitseinlagerungen in der Haut, Blasenbildung und zur Eliminierung der Antigen-tragenden Zellen.
Die allergische Kontaktdermatitis ist eine T-Zell vermittelte Immunantwort. Sie ist spezifisch gegen Umweltantigene gerichtet und manifestiert sich in unterschiedlichen Schweregraden in Rötungen, Spongiosen (Wassereinlagerungen in der Epidermis) und Vaskularisierungen (Gefäßbildung) der Haut. Die Pathophysiologie ist durch eine Infiltration an aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen charakterisiert.

1.3.2 Funktion der Keratinozyten bei allergischen Reaktionen

Die Keratinozyten sind hornbildende Zellen und machen ca. 90% der Zellen in der Epidermis aus. Sie stammen von epidermalen Stammzellen ab, die sich im Bereich des *Stratum basale* oder aber im Bereich der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel befinden. Keratinozyten durchwandern, während sie von nachkommenden Zellen nach oben geschoben werden, mehrere Stadien der Entwicklung, bis sie im *Stratum corneum* eine Schicht aus abgeflachten, toten Korneozyten bilden. Dort bildet es eine Barriere, die Fremdkörper und Keime abhält und den Körper vor Austrocknung schützt. Die Zeit zwischen Differenzierung im *Stratum basale* und Abschilferung als Korneozyt im *Stratum disjunctum* beträgt etwa einen Monat, kann aber bei bestimmten Erkrankungen, z.B. Psoriasis, verkürzt sein.
Keratinozyten sind aktiv an der Initiierung von Immunantworten, an Entzündungsprozessen und bei der Wundheilung beteiligt. Sie können eine Vielzahl von Zytokinen,

Wachstumsfaktoren und sogar Komplementfaktoren produzieren. Bei vielen chronisch entzündlichen Hauterkrankungen werden insbesondere TSLP, PGE2, TNF-□ aber auch viele andere Interleukine und Chemokine freigesetzt. Außerdem kommt es durch Reibungen, Überdehnungen, oxidativen Stress und mikrobielle Stoffen zu einer Freisetzung von ATP [Hamada et al., 1998]. Mizumoto et al. konnten zeigen, dass es bei irritierenden Stoffen, wie DNFB auch der Fall war [Mizumoto et al., 2003]. DC nehmen den erhöhten ATP Spiegel wahr und reagieren mit einer verstärkten Expression an costimulatorischen Molekülen und einer reduzierten Endozytosekapazität. Durch die Stimulierung der Keratinozyten kommt es zu einer Aktivierung der DC der Haut.

1.4 Langerhans Zellen und dermale DC

Langerhans Zellen (LZ) sind eine Subpopulation von DC, die 3-5% der Zellen in der Epidermis der Haut [Romani et al., 2003; Schuler et al., 1985] und in der mukosalen Epithelschicht von Mundschleimhaut und Vagina ausmachen. Diese Zellen wurden nach Paul Langerhans benannt, der sie bereits 1868 entdeckte und aufgrund ihrer dendritenförmigen Ausläufer zunächst für Nervenzellen innerhalb der Epidermis hielt. Die LZ lassen sich von anderen DC aufgrund spezifischer Organellen, den Birbeck Granula, unterscheiden. Zudem exprimieren sie ein Typ II Transmembran Lektin, das Langerin. Es ist ein Bestandteil der Birbeck Granula und bindet Mannosestrukturen. Heute gilt Langerin als ein Kennzeichen für diese Zellen.
In der Dermis findet man die dermalen DC (dDC), welche erst 120 Jahre nach den LZ identifiziert wurden. Sie sind zwischen den Kapillaren im oberen Teil der Dermis angesiedelt. Inzwischen konnten neure Studien zeigen, dass nicht nur LZ der Epidermis Langerin exprimieren, sondern auch eine Population an dDC [Ginhoux et al., 2007]. Daher gibt es zwei Populationen dDC, die sich einzig in ihrer Expression von Langerin unterscheiden. Die Identifizierung der Langerin+ dDC war möglich durch die konditionale Ablation von LZ und der Beobachtung, dass sich die Langerin+ dDC innerhalb von 5-7 Tagen in der Dermis neu ansiedeln [Bursch et al., 2007; Ginhoux et al., 2007; Poulin et al., 2007], während die LZ der

Epidermis nach zwei Wochen noch nicht zu detektieren waren [Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005].

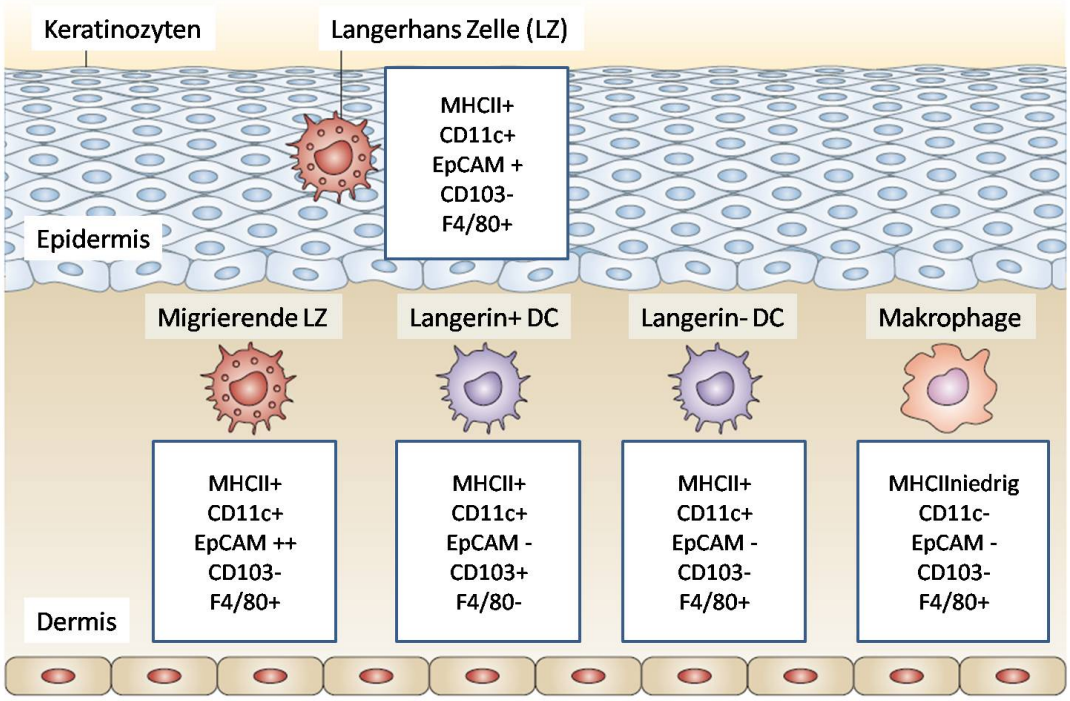


Abbildung 1: Subtypen der DC Populationen in der Haut.

Gezeigt ist eine schematische Übersicht der Oberflächenmoleküle, die eine Unterscheidung der verschiedenen DC Gruppen innerhalb der Haut von Mäusen ermöglichen. Zum Vergleich wurden die Makrophagen mit aufgeführt. Graphische Darstellung abgeändert von [Merad et al., 2008].

Die Langerin+ dDC sind, basierend auf dem Expressionslevel von MHCII, CD11c und Langerin, nicht von den LZ der Epidermis zu unterscheiden. Nur aufgrund der Expression von dem Eβ7 Integrin CD103 lassen sich die beiden Zellpopulationen separieren. CD103 ist ein Ligand für das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin und wird von den meisten epithelialen Zellen exprimiert. Langerin+ dDC exprimieren CD103, hingegen sind epidermale LZ und andere dDC Populationen CD103 negativ [Bursch et al., 2007]. Die Langerin+ dDC in der Dermis machen nur einen kleinen Teil der dDC-Population aus. Dafür tragen sie aber zur Hälfte der Langerin+ DC im Haut drainierenden LK (hdLK) bei [Bursch et al., 2007; Ginhoux et al., 2007; Poulin et al., 2007]. Langerin wird im hdLK zusätzlich von residenten CD8+ DC

exprimiert, wobei diese Zellpopulation leicht von den anderen Langerin+ DC unterschieden werden kann [Kissenpfennig et al., 2005; Takahara et al., 2002].Zusammenfassend kann man sagen, dass die hdLK drei Langerin+ DC Populationen beinhalten: epidermale Langerin+CD103-negative LZ, Langerin+CD103+ dDC und die im Lymphknoten residenten CD8+Langerin+CD103± DC. Während die LZ zum T-Zell-reichen Parakortex im LK migrieren, haben die dDC die äußere Zone des Parakortex, direkt neben den B-Zell Follikeln, als Ziel. Daher wird angenommen, dass beiden DC Zellpopulationen unterschiedliche Aufgaben zu teil werden, die bisher aber wenig untersucht wurden.

1.4.1 Funktion von LZ

LC besitzen eine immunstimulierende Wirkung. Aktivierte reife LZ regulieren während der Migration in den LK die Expression von costimulatorischen Molekülen, sowie MHCI und MHCII auf. Gleichzeitig sezernieren sie Zytokine, die für die Induzierung einer Th1- oder Th2-Antwort benötigt werden. Wenn sie im LK ankommen, sind sie völlig ausgereift und in der Lage naïve T Zellen zu aktivieren und eine adaptive Immunantwort zu induzieren [Romani et al., 2003]. Die Induzierung einer Immunantwort gegen ein Pathogen wurde lange Zeit als einzige Aufgabe der DC im Immunsystem angenommen. Sie besitzen alle notwendigen Eigenschaften, um diese Aufgabe gut zu erfüllen [Steinman, 1991].

Inzwischen weiß man, dass LZ auch die Fähigkeit besitzen eine immuntolerogene Wirkung zu erzielen. Ständig wandern LZ auch unter nicht-inflammatorischen Bedingungen zum drainierenden LK. Sie wurden aber nicht durch aktivierende Signale in einen stimulierenden Zustand versetzt. Vielmehr präsentieren sie den T-Zellen die in der Peripherie aufgenommenen Antigene, welche nur körpereigene Peptide sind. Für LZ konnte gezeigt werden, dass sie z.B. von den Melanozyten der Haut Melanin im LK präsentieren [Hemmi et al., 2001]. Reagieren T-Zellen auf das Antigen, so werden sie in Anergie versetzt, d.h. ruhig gestellt oder eliminiert und eine periphere Toleranz gegenüber dem Körper („Selbst“) kann aufrecht erhalten werden [Hawiger et al., 2001; Liu et al., 2002]. Neben der positiven und

negativen Selektion im Thymus ist das ein weiterer Mechanismus, um autoreaktiven Immunantworten vorzubeugen.
Die Expression von Liganden für costimulatorische Moleküle oder die Expression des immunregulierende Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase ermöglichen es den LZ zusätzlich eine Toleranz aufrechtzuerhalten [von Bubnoff et al., 2004].

1.4.2 Rolle der LZ bei CHS Reaktionen

Die CHS-Immunantwort gegenüber Haptenen ist das meist genutzte Mausmodel, um allergische Kontaktdermatitis zu studieren. Eine Rolle von LZ in dieser Krankheit, obwohl es viele Hinweise dafür gibt, konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden.
Man weiß bereits, dass nach der Applikation von einem Hapten murine LZ die Expression von Reifungsmarkern, wie MHCII, CD40, CD80 und CD86 heraufregulieren und die Antigenpräsentation erhöht wird [Aiba and Katz, 1990]. Zudem sezernieren sie verstärkt IL-1ß, welches Entzündungsreaktionen fördert. Auch MMP9 (Metalloproteonase 9) [Kobayashi, 1997] und ß1-Integrine [Staquet et al., 1992] werden verstärkt gebildet. Zusammen mit der Runterregulierung von E-Cadherin [Schwarzenberger and Udey, 1996], CLA (*engl. cutaneous T cell antigen*) [Ebner et al., 1998] und der erhöhten mRNA Expression von CCR7 [Dieu et al., 1998] ist es den LZ möglich, aus der Haut in die drainierenden LK zu migrieren.
Im Gegensatz dazu konnten Chemikalien, die die Haut nur irritieren, kein Ausreifen der LZ bewirken [Aiba and Katz, 1990].
Die Generierung von Mäusen, in denen eine konditionale Depletion von LZ möglich ist, erlaubte es, dieser Frage nach der Rolle von LZ bei CHS Reaktionen gezielter nachzugehen. Mäuse, die mit einem Hapten auf der Haut immunisiert wurden, zeigten, dass wandernde dDC essentiell sind, um eine CHS zu vermitteln, LZ hingegen verzichtbar waren [Kissenpfennig et al., 2005]. Inzwischen ist aber bekannt, dass LZ sehr wohl nötig sind, um eine effiziente Immunantwort zu initiieren, wenn das Antigen auf die Epidermis aufgetragen wird und nicht bis zur Dermis diffundieren kann, [Bennett et al., 2007; Wang et al., 2008]. Im

Kontrast dazu steht, dass bei transgenen Mäusen, denen LZ von Geburt an fehlen, eine verstärkte Immunantwort nach Sensibilisierung zu beobachten ist [Kaplan et al., 2005].

1.4.3 Die Wanderung von Dendritischen Zellen ist von Chemokinen gesteuert

Chemokine werden abhängig von strukturellen Merkmalen, ihrer Größe (8-10kDa) und dem Vorhandensein von Cysteinresten in Gruppen eingeteilt. Alle Chemokine sind hoch homolog, können aber aufgrund von Unterschieden am aminoterminalen Bereich, in vier Klassen unterteilt werden. Von den über 50 bekannten Chemokinen gehören allein 27 zu der Gruppe der CC-Chemokine. CC-Chemokine enthalten zwei nebeneinander liegende Cysteinreste, während z.B. bei den CXC-Chemokinen die Cysteinreste durch eine weitere Aminosäure verbunden sind.

Der Name Chemokin kommt von der Fähigkeit Chemotaxis, also eine gerichtete Bewegung zu vermitteln. Ursprünglich wurden sie als chemotaktische Zytokine beschrieben und erhielten Namen (engl.) wie: *SIS family of cytokines*, *SIG family of cytokines*, *SCY family of cytokines*, *Platelet factor-4 superfamily* or *intercrines*. Heute weiß man, dass sie zusätzlich eine entscheidende Rolle bei Entwicklungsprozessen einnehmen, Angiogenese fördern, sowie als Reifungs- und Überlebenssignal fungieren können [Sanchez-Sanchez et al., 2006]. Einige Chemokine gelten als pro-inflammatorisch und werden während einer Immunantwort induziert, um Zellen des Immunsystems an den Entzündungsherd zu locken. Andere hingegen werden konstitutiv exprimiert und sorgen für ein Gleichgewicht von ein- und auswandernden Zellen im Gewebe [Homey et al., 2006]. Chemokine vermitteln ihre biologischen Effekte durch die Interaktion mit G-Protein gekoppelten Siebentransmembranrezeptoren, die von den Zielzellen exprimiert werden. Jedes Chemokin interagiert mit einem oder mehreren Chemokinrezeptoren und wirkt auf verschiedene Zelltypen [Baggiolini, 1998]. Bei den DC Vorläuferzellen ist zurzeit über die Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren nur wenig bekannt. Man weiß, dass CCR2 eine Rolle bei der Einwanderung der Vorläuferzellen in das periphere Gewebe spielt [Vanbervliet et al.,

2002]. Außerdem exprimieren diese DC CXCR4, welcher CXCL12 binden kann. CXCL12 wird konstitutiv im lymphoiden Gewebe sezerniert und hat daher eine Bedeutung bei der Rekrutierung von DC, um deren Menge im Gewebe konstant zu halten [Vecchi et al., 1999; Zou et al., 2001]. Da die verschiedenen Gewebe jeweils spezifische Chemokine exprimieren und die verschiedensten DC Vorläufer unterschiedliche Chemokinrezeptoren besitzen, ist ein gesteuertes Einwandern von spezifischen DC möglich.

Unreife DC exprimieren induzierbare Chemokinrezeptoren, wie CCR1, CCR5 und CXCR2 [Dieu et al., 1998; Stumbles et al., 2001; Vecchi et al., 1999], sezernieren selber aber auch eine Reihe an Chemokinen, wie CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 und CXCL10. Dies regt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an [Foti et al., 1999; Padovan et al., 2007]. Im unreifen Zustand befinden sich die DC im gesunden peripheren Gewebe, wie z.B. der Haut, wo sie kontinuierlich Antigene aufnehmen. Nach einer Stimulation mit TLR (Toll-like-Rezeptor)-Liganden wie LPS, LTA oder CpG reifen die DC und verlieren die Expression von CCR1, CCR5 und CXCR2 [Sallusto et al., 1998b; Sozzani et al., 1999; Vecchi et al., 1999]. Da sie in peripheren Geweben naïve T-Zellen nicht aktivieren können, um eine Immunantwort einzuleiten [Banchereau et al., 2000], müssen sie aus dem Gewebe in die drainierenden LK migrieren. Die Heraufregulierung des Rezeptors CCR7 [Ohl et al., 2004] ermöglicht eine Sensibilisierung für die konstitutiven Chemokine CCL19 und CCL21. Dieser Schritt ist entscheidend für die gerichtete Wanderung der reifen DC in den drainierenden LK [Sallusto et al., 1999; Sallusto et al., 1998b], da CCL19 und CCL21 konstitutiv in den T-Zell Zonen und von den „*high endothelial venules*“ (HEVs) exprimiert wird [Baekkevold et al., 2001; Luther et al., 2000; Saeki et al., 1999]. In Abwesenheit von CCL19 und CCL21 oder CCR7 kommt es zu einer deutlich reduzierten Migration von DC aus dem peripheren Gewebe in die Lymphorgane [Nakano and Gunn, 2001; Saeki et al., 1999]. Die DC-Einwanderung war jedoch nicht völlig verhindert. Weitere Chemokine und ihre Rezeptoren sind am komplexen Migrationsprozess beteiligt. CXCL12 (SDF-1) ist ein weiteres konstitutiv exprimiertes Chemokin, welches in den dermalen lymphatischen Geweben [Kabashima et al., 2007] und von Fibroblasten exprimiert wird [Ouwehand et al., 2008]. Der Rezeptor CXCR4 wird von unreifen und stärker noch von reifen DC exprimiert. Wird CXCR4 mit einem spezifischen Antagonisten (4-F-benzoyl-TN14003) blockiert, so ist die Migration während der

Sensibilisierungsphase einer Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion von dermalen als auch epidermalen DC um 50% reduziert [Kabashima et al., 2007].

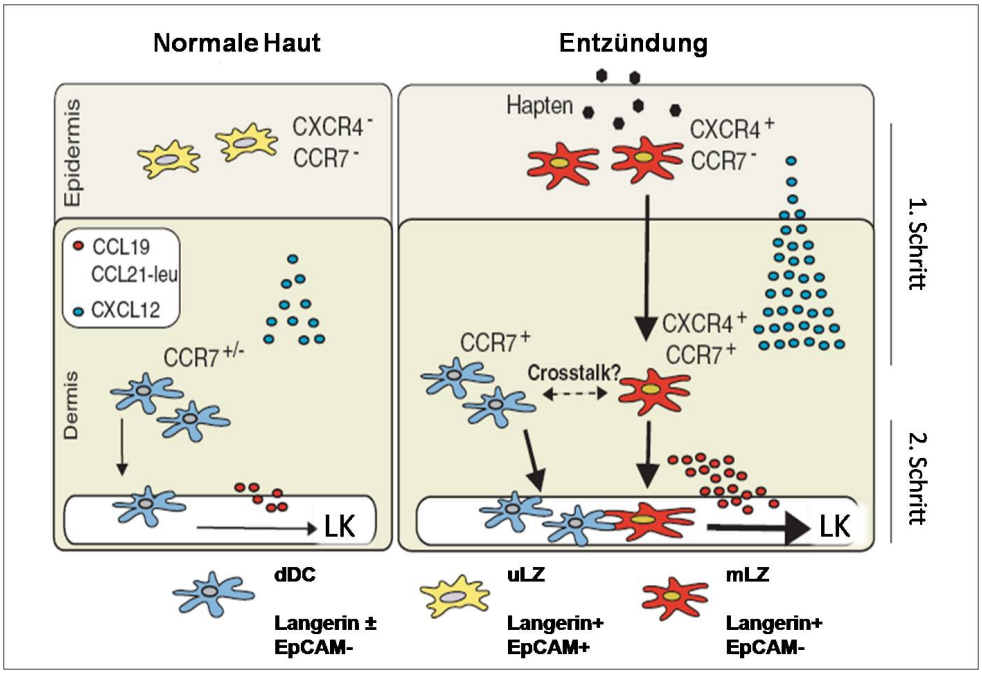


Abbildung 2: Zwei-Schritt-Modell der LZ Wanderung zum drainierenden LK in Abhängigkeit von CXCR4 und CCR7.
Die schematische Abbildung zeigt die Migration von dermalen DC (dDC), unreifen LZ (uLZ) und aktivierten migrierende LZ (mLZ) während normalen Bedingungen und bei einer entzündlichen Immunreaktion, ausgelöst durch ein Hapten. Abbildung ist entnommen und geändert nach Villablanca et al. [Villablanca and Mora, 2008].

Bei den LZ der Haut ermöglicht eine Herunterregulierung von E-Cadherin das Lösen der LZ von benachbarten Zellen innerhalb der Epidermis [Jakob et al., 2001]. Außerdem kommt es zur höheren Expression an MHCII [Larsen et al., 1990; Pierre et al., 1997] und kostimulatorische Molekülen, wie z.B. CD40 [Ruedl et al., 2000]. Um in hdLK einzuwandern, müssen die LC der Haut nach der Reifung ihr Chemokinrezeptor-Repertoire neu arrangieren. Zurzeit wird folgendes Modell, welches die Auswanderung von LZ aus der Haut beschreibt, angenommen (siehe Abb. 2): Nach dem inflammatorischen Reiz regulieren die LZ CXCR4 herauf. CXCR4 wird von unreifen und stärker noch von reifen DC exprimiert. LZ wandern in Abhängigkeit von CXCL12 und unabhängig von CCR7 in die Dermis [Ouwehand et al., 2008]. Dort angekommen, regulieren die LZ aber CCR7 herauf, um so in die dermalen

lymphatischen Gewebe einzuwandern und zum hdLK finden zu können. Der zusätzliche Schritt der CXCR4 Hochregulierung, könnte erklären, warum gerade LZ 3-4 Tage brauchen, um den LK zu erreichen, wohingegen dDC schon nach 24h im hdLK zu detektieren sind. Die Wanderung von LZ erfolgt dennoch schneller als im nicht aktiviertem Zusstand, da unter inflammatorischen Bedingungen CXCL12 verstärkt exprimiert wird [Ouwehand et al., 2008] und die Wanderung der LZ aus der Epidermis in die Dermis schneller erfolgen kann [Ouwehand et al., 2008].

1.5 Atopische Dermatitis

Das Wort Atopie kommt aus dem Griechischen. Wörtlich übersetzt bedeutet es "das Ungewöhnliche". Damit war gemeint, dass Atopiker eine ungewöhnliche Bereitschaft zeigten, auf Umwelteinflüsse allergisch zu reagieren. Die atopische Dermatitis (AD) ist eine entzündliche, chronische Hautkrankheit, charakterisiert durch schuppende, teilweise nässende Ekzeme, welche von einem starken Juckreiz begleitet sind [Novak et al., 2003]. Als Ursache gilt eine gestörte epitheliale Schutzschicht der Haut sowie eine veränderte Regulation des Immunsystems [Elias et al., 2008], beides kann Folge einer genetischen Prädisposition sein. Neuerkrankungen treten häufig bei sehr jungen Kindern auf. 10-20% aller Neugeborenen sind in westlichen Ländern von dieser Krankheit betroffen. Fünfzig Prozent der AD Patienten haben eine Prävalenz für andere atopische Krankheiten, wie Heuschnupfen, Asthma und allergische Rhinitis [Spergel and Paller, 2003]. Die extrinsische oder allergische AD, von der fast 80% aller AD Patienten betroffen sind, ist durch hohe Allergen-spezifische IgE-Spiegel im Blut gekennzeichnet [Novak et al., 2003].

Die AD verläuft in einer akuten und einer chronischen Phase. Histologisch lassen sich in der akuten Phase vor allem aktivierte CD4+ und CD8+ T-Zellen, Mastzellen, Eosinophile und FcεRI-exprimierende Zellen in der Dermis nachweisen [Novak, 2009; Novak et al., 2003]. Die Anzahl der in die betroffenen Hautregionen infiltrierten Eosinophilen korreliert hierbei mit der Schwere der Erkrankung. Das Gewebe organisiert sich neu, es wird mehr Kollagen eingelagert, dies führt zu einer Verdickung der Dermis. [Jin et al., 2009]. Zudem erfolgt eine

verstärkte Produktion von Th2-Zytokinen, wie IL-4, IL-5 und IL-13. IL-4 steuert den Isotypwechsel zu IgE. Diese Merkmale können einer Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I (Coombs und Gell) zugewiesen werden. In der chronischen Phase wird die Produktion von IFNγ induziert, und es kommt zu einer Verschiebung der Immunreaktion zu Th1 [Grewe et al., 1998]. Die Th-1 Zellen fungieren hierbei als Effektorzellen und sind für eine zelluläre Immunreaktion vom verzögerten Typ IV verantwortlich. Die AD setzt sich demnach aus zwei Allergietypen zusammen.

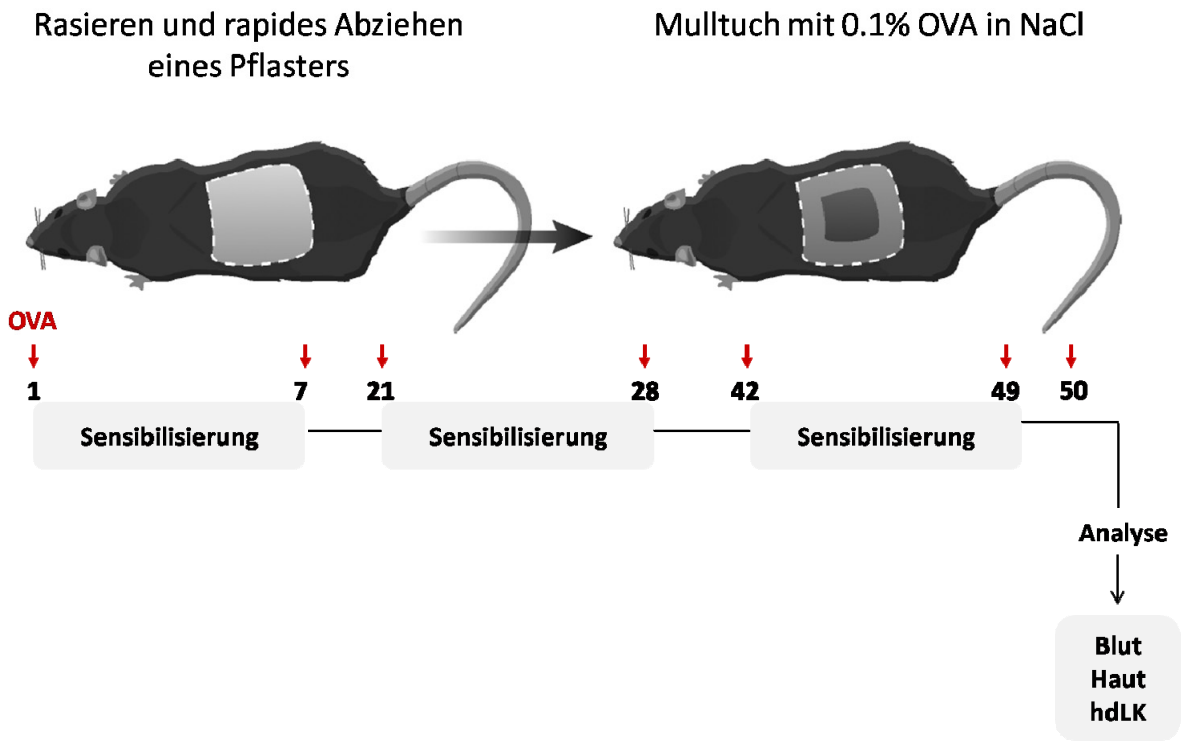


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Mausmodells der Atopischen Dermatitis.

Die Methode wird mit kleinen Veränderungen nach dem Protokoll von Spergel et al. durchgeführt. Nach mechanischer Reizung wird eine 1% Lösung mit Ovalbumin (OVA) in NaCl oder nur NaCl epikutan aufgetragen. Das Pflaster mit dem Antigen/Lösungsmittel getränktem Tuch verbleibt für eine Woche und nach 2 wöchiger Pause wird diese Behandlung noch zweimal wiederholt. 24h nach der letzten Behandlung wird das Serum aus dem Blut, die brachialen (als drainierende) LK und die behandelte Haut entnommen und analysiert.

Neuere Daten zeigen, dass viele pro-allergische und pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine verstärkt in läsionaler Haut und im Serum von AD-Patienten zu finden sind [Homey et al., 2006]. Da bisher keine zufriedenstellende Therapie bekannt ist, bedarf es weiterer Studien über den Verlauf dieser Krankheit, um neue Ansätze für die Medikamentenentwicklung zu erhalten. Aus diesem Grund ist es nötig, geeignete Tiermodelle zu etablieren. Vor allem Hunde oder Meerschweinchen können spontan AD-typische Symptome entwickeln. Dennoch wird oft das Mausmodell bevorzugt, da Mäuse reichlich verfügbar und genetisch manipulierbar sind. Die Mausmodelle kann man in drei Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe können Mäuse spontan AD-ähnliche Hautläsionen entwickeln [Gao et al., 2004]. Im zweiten Modell werden transgene Mäuse verwendet, bei denen bestimmte Moleküle überexprimiert werden oder ganz fehlen. Ein Beispiel ist die Überexpression von TSLP in der Epidermis [Yoo et al., 2005]. In der dritten Gruppe wird ein Modellallergen chronisch auf die Haut von WT Mäusen aufgetragen. In dieser Arbeit wurde das dritte Mausmodell angewendet und nach dem Protokoll von Spergel et al. [Spergel et al., 1998] mit kleinen Veränderungen durchgeführt (siehe Abbildung 3): Die Haut wird zuerst mechanisch gereizt, was den Juckreiz und Kratzverhalten der Patienten nachahmt und die epidermale Barriere zerstört. Ein Allergen (hier Ovalbumin) wird dreimal eine Woche lang aufgetragen, wobei die einzelnen Wochen durch 2 Wochen Pause unterbrochen sind (siehe Abbildung 3). Am Tag 51 wird das Serum gewonnen und die Immunantwort lokal an Hautbiopsien und den drainierenden LK analysiert.

In den Hautläsionen von AD Patienten sind antigenspezifische aktivierte T-Zellen nachgewiesen worden. Diese T-Zellen konnten durch die Expression von CLA organspezifische Signale empfangen und in die Haut einwandern. Sie sezernieren hohe Mengen an Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13, sodass eine Th2-dominante Immunreaktion induziert wird. Auch der Chemokinrezeptor CCR10 und das mit der Haut assoziierte Chemokin CCL27 sind in den Prozess der T-Zell-Einwanderung in die entzündliche Haut, den man als „T-cell homing“ bezeichnet, beteiligt (21).
Da die Einwanderung von T-Zellen in der Initialphase der AD eine bedeutende Rolle für die Entstehung der Entzündungsreaktion spielt, bietet dieser Mechanismus einen günstigen

Ansatzpunkt neuer therapeutischer Strategien. Dabei soll versucht werden, durch gezielte Blockierung der Interaktion von Chemokinen mit deren Liganden auf den T-Zellen die Rekrutierung von T-Zellen in die Haut zu blockieren.

1.6 Das Chemokin CCL17 und seine Bedeutung im Immunsystem

Das Chemokin CCL17 (*thymus and activation regulated chemokine*; TARC) gehört zur β(CC)-Familie der Chemokine und wird ausschließlich von reifen myeloiden DC sezerniert. Während Entzündungsreaktionen kommt es durch TLR-Stimulation [Alferink et al., 2003] oder aber durch proinflammatorische Mediatoren, wie IL-4 [Xiao et al., 2003], TNF [Xiao et al., 2003], TSLP [Soumelis et al., 2002], Histamin und Prostaglandin E2 (PGE2) [McIlroy et al., 2006] zu einer CCL17 Aktivierung. Die Gegenwart von IFNγ wirkt sich hingegen inhibierend auf CCL17 aus [Xiao et al., 2003]. CCL17, wie auch das strukturell ähnliche Chemokin CCL22, binden an den Rezeptor CCR4 [Bonecchi et al., 1998]. Dieser wird vor allem von Th2- [Sallusto et al., 1998a], NK-T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert, die damit in Gewebe mit hoher CCL17 und CCL22 Konzentration rekrutiert werden [Imai et al., 1996; Lieberam and Forster, 1999]. CCL17 und der Rezeptor CCR4 spielen eine Rolle von CCL17 bei Th2 gerichteten Immunreaktionen und wurde im Zusammenhang mit endotoxischen Schock [Chvatchko et al., 2000], beim systemischen Lupus erythematodes [Okamoto et al., 2003], beim Hodgkin's Lymphoma [Weihrauch et al., 2005], sowie bei T-Zell-non-Hodgkin-Lymphomen [Peh et al., 2001] und bei der pulmonaren Fibrose [Thielen et al., 2008] stark exprimiert gefunden. Obwohl für die Chemokine CCL17 und CCL22, sowie für deren Rezeptor CCR4 gezeigt werden konnte, dass deren Expression in normaler Haut negativ ist, nimmt bei AD deren Expression dramatisch zu und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung [Gombert et al., 2005; Kakinuma et al., 2001; Saeki and Tamaki, 2006; Shimada et al., 2004; Song et al., 2006]. Außerdem korreliert die Expression von CCL17 auch mit der Ausprägung von anderen atopischen Krankheiten, wie allergischem Asthma [Medoff et al., 2008] und allergischer Rhinitis [Terada et al., 2001].

Die Generierung von Reporter-Mäusen, bei denen unter der Kontrolle des *ccl17*-Promoters die Expression des *„enhanced green fluorescent protein;* EGFP“ reguliert ist [Alferink et al., 2003], zeigte, dass CCL17 speziell von einer DC-Subpopulation sezerniert wird, die CD8α-CD11b+DEC205+ ist und hohe Expressionen an Reifungsmarkern aufweist. Weiterhin konnte die Lokalisation der CCL17+ DC für die peripheren LK, sowie für Organe, die im direkten Kontakt mit der Umwelt stehen, wie zum Beispiel Lunge und Darm, gezeigt werden. Interessanterweise ist die Expression von CCL17 in der Milz abwesend [Alferink et al., 2003].
Heterozygote Tiere (CCL17E/+) exprimieren EGFP und das funktionelle Chemokin CCL17. Homozygote Mäuse (CCL17E/E) exprimieren nur EGFP und besitzen kein funktionelles CCL17. Diese Mäuse werden als Knockout Mäuse für CCL17 verwendet.
Im Mausmodell der CHS, wird die Stärke der T-Zell vermittelten Zweitantwort durch Messung der Ohrschwellung ermittelt. Alferink et al. konnten zeigen, dass in Abwesenheit von CCL17 es zu einer deutlich schwächeren T-Zellantwort kommt. Gleichzeitig zeigte sie, dass CCL17+ DC durch die Sezernierung von IL-12 und der Induzierung einer T-Zellproliferation eine immunstimulierende Wirkung besitzen [Alferink et al., 2003].

1.7 Zielsetzung

Die AD ist eine entzündliche, chronische Hauterkrankung, deren Ursache eine gestörte epitheliale Schutzschicht der Haut und eine veränderte Regulation des Immunsystems ist.
Studien zeigten, dass die Expression des Chemokins CCL17 mit dem Schweregrad der AD korreliert. CCL17 wird ausschließlich von aktivierten myeloiden DC sezerniert. Gleichzeitig werden die Immunreaktionen der allergischen AD von den DC der Haut vermittelt. Für die genaue Untersuchung welche Rolle CCL17 bei allergischen Immunreaktionen, insbesondere bei der AD spielt, ist es essentiell die Funktion der DC in An- und Abwesenheit von CCL17 zu analysieren. Die DC der Haut sind allerdings eine heterogene Population, die aus LZ, dDC und Langerin+ dDC besteht. Es ist daher entscheidend die DC Subpopulationen der Haut eindeutig zu charakterisieren und getrennt voneinander zu betrachten. Bisher war die Identifizierung der DC-Subtypen in der Haut nur mit Antikörperfärbungen gegen diverse Oberflächenantigene möglich, die zudem mit einer intrazellulären Färbung gegen Langerin gekoppelt waren. Diese intrazelluläre Färbung benötigt aber eine Fixierung der Zellen, die dadurch absterben. Hinzu kommt, dass die DC der Haut überlappende Expressionsmuster aufweisen, was eine aufwendige Färbeprozedur nötig macht, wenn man die Zellpopulationen getrennt voneinander untersuchen will. In dieser Arbeit soll zunächst eine Methode etabliert werden, um auf einfache und eindeutige Weise die LZ und dDC in der Haut sowie im drainierenden LK darzustellen. Für die Verifizierung dieser Methode sollen die zuvor beschriebenen Eigenschaften der dDC und LZ bestätigt werden. Zu diesen Eigenschaften zählt das Wanderungsverhalten nach der Aktivierung durch ein Hapten, sowie die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern. Wurde eine geeignete Methode gefunden, ist es möglich den Beitrag von dDC und LZ zur Pathogenese der AD in Abhängigkeit von CCL17 zu analysieren.

Gesunde Haut weist keine CCL17 Expression auf. Bei AD Patienten korreliert der Schweregrad der Erkrankung mit der Höhe der CCL17-Expression und des Rezeptors CCR4. CCR4 wird vor allem von Th2-, NK-T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert. Zudem war CCL17 bisher dafür bekannt, präferentiell Th2-Zellen an den Ort der

CCL17 Sezernierung zu locken. Diese sezernieren nach Antigenerkennung diverse Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 und stimulieren die humorale Immunantwort. Um die Ausprägung der Krankheitssymptome der AD in Abhängigkeit von CCL17 zu untersuchen, wird in dieser Arbeit das AD Mausmodell bei CCL17-defizienten und vergleichend bei CCL17E/+ Mäusen angewendet. Dabei wird die Auswirkung der Abwesenheit von CCL17 auf die Allergen-spezifische Antikörperbildung und die Infiltration von Leukozyten in die Haut untersucht. Mit dieser Studie soll die potentielle Anwendbarkeit eines CCL17-Inhibitors für die Therapie atopischer Erkrankungen, ins Besondere der AD untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus, Düsseldorf
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg
ELISA Reader	Biotek, Bad Friedrichshall
Grobwaage Kern 440-35N	Kern, Balingen-Frommern
Kryostat	Leica, Nussloch
FACS Calibur	BD, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Düsseldorf
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Hereaus Multifuge	Heraeus, Düsseldorf
Mikroskope:	
Eclipse E100	Nikon, Düsseldorf
AxioCamMR3	Zeiss, Göttingen

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
FACS-Röhrchen (Falcon)	BD Bioscience, Heidelberg

Einmalreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen	BD Bioscience, Heidelberg
Kanülen Microlance	BD Bioscience, Heidelberg
Tegaderm® 1624W	3M Medica, Neuss
ELISA-Platten (Microlon 96W)	Greiner, Frickenhausen
ImmEdge Stift	Vector Lab. Inc., Burlingame, USA
24-Lochkammern für das Transwell	Costar, Cambridge, MA, USA

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Plastikverbrauchsmaterialien von Greiner, Frickenhaus oder Sarstedt, Nürnberg bezogen.

2.1.3 Stammlösung oder Puffer

Stammlösung oder Puffer		Zusammensetzung
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na2HPO4
	1,5 mM	KH2PO4
		ph 7.4
FACS Puffer	Fertiglösung	BD, Heidleberg
Saponin (FACS)	0.5%	Saponin
	1%	BSA in PBS
Wasch Puffer (ELISA)	0.05%	Tween 20 in PBS
Block Puffer (ELISA)	1% (w/v)	BSA in PBS
Trypanblau	0,25%	in PBS, Sigma-Alderich, Taufkirchen

Mowiol	6 g	Glycerin
	2,4 g	Mowiol 4-88
	6 ml	dest. Wasser
	12 ml	0.2 M Tris-HCL (pH8.5)
	25 mg/ml	DABCO
5% Sucrose-Lösung	5 % (w/v)	Sucrose, 1 x PBS
10% Sucrose-Lösung	10 % (w/v)	Sucrose, 1 x PBS
20% Sucrose-Lösung	20 % (w/v)	Sucrose, 1 x PBS
Einfriermedium	100%	Jung, Nussloch
Entellan		Merck, Darmstadt
Eosin (alkoholisch)		Sigma-Alderich, Taufkirchen
Hämatoxylin		Sigma-Alderich, Taufkirchen
OVA (AD-Mausmodell)	100 µg	Ovalbumin (Huhn), Sigma-Adrich, Taufkrichen
Isofluran	4%	in med. Sauerstoff, CP-Pharma, Burgdorf

2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme		Hersteller
Kollagen I		Pure Col, Inamed
MEM	1x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagenase D	1 mg/ml	Roche, Grenzach-Wyhlen
Kollagenase P	2,5 mg/ml	Roche, Grenzach-Wyhlen
DNaseI	300 U/ml	Roche, Grenzach-Wyhlen
	500 U/ml	
PMA	10 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ionomycin	1µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNFB	0,5% und	in Aceton/Olivenöl (5:1)
	0,3%	Sigma-Alderich, Taufkirchen
LPS (O11:B4)		Sigma-Alderich, Taufkirchen
Peroxidase-Substrat		KEM-EN-TEC, Dänemark
(TMB Plus)		
Schwefelsäure (H_2SO_4)		Merck, Darmstadt
Trypsin	0,25%	in PBS, PAA, Pasching, Österreich
CCL19 und CCL21	200ng/ml	R&D, Wiesbaden
	600ng/ml	

2.1.5 Medien

Chemikalien und Enzyme		**Hersteller**
RPMI 1640		PAA, Pasching, Österreich
Zusätze	10% v/v	FKS, PAN Aidenbach
	1%	L-Glutamin, Invitrogen, Karlsruhe
	1%	Penicillin-Streptomyocin, Invitrogen, Karlsruhe
	0,1%	2-MeEtOH, Sigma-Aldrich,Taufkirchen

Für die Generierung von DC aus Knochenmark wurde den Kulturen 2% Überstand einer GM-CSF-transfizierten Zelllinie X63Ag8–653-F [Karasuyama and Melchers, 1988] zugegeben.

2.1.6 Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies	Konzentration	Verwendung	Quelle
CD16/CD32 (Fc Block)	93	Ratte	1:100	FACS	ebioscience
α-Maus CD11c	N418	armenischer Hamster	1:100	FACS	ebioscience
α-Maus CD14	rmC5-3	Ratte	1:100	FACS	BD
α-Maus CD24a	M1/69	Ratte	1:500	FACS	ebioscience
α-Maus CD3	145-2C11	Ratte	1:100	FACS	ebioscience
α-Maus CD4	GK1.5	Ratte	1:100	FACS	ebioscience
α-Maus CD40	3/23	Ratte	1:100	FACS	BD
α-Maus CD8a	53–6.7	Ratte	1:100	FACS	ebioscience
α-Maus FoxP3	FJK-16s	Ratte	1:100	FACS	ebioscience
α-Maus IFNg	XMG1.2	Ratte	1:100	FACS	BD
α-Maus IL-17	TC11-18H10	Ratte	1:100	FACS	BD
α-Maus IL-4	BVD4-1D11	Ratte	1:100	FACS	BD
α-Maus IL-5	TRFK5	Ratte	1:100	FACS	BD
α-Maus Langerin	926G4	Ratte	1µg/ml	FACS	AbCys
α-Maus MHCII	M5/114.15.2	Ratte	1:1000	FACS	BD
α-Maus CCR4	polyclonal	Ziege	1:100	FACS	Abcam
α-Maus CCR7	4B12	Ratte	1:100	FACS	ebioscience
α-Maus CD11c	HL3	armenischer Hamster	1:100	IF	BD
α-Maus MHCII	M5/114.15.2	Ratte	1µg/ml	IF	BD
α-Maus CD4	RM4-5	Ratte	1:100	IF	BD
α-Maus FcεR1	MA1	Ratte	1:100	IF	ebioscience
α-GFP		Kaninchen	1:500	IF	Invitrogen

Golgi-Stop®			0,8µl/ml	FACS	BD
α-IgG	G70-204, G94-56		1:100	FACS	BD
Hamster Cocktail					
IgE Standard			200µg/ml	ELISA	BD
α-Maus- IgE	R35-72	Ratte	2µg/ml	ELISA	BD
α-Maus- IgE	R35-118	Ratte	2µg/ml	ELISA	BD
α-Maus- IgG1	A85-1	Ratte	2µg/ml	ELISA	BD
α-Maus- IgG2a	R19-1	Ratte	2µg/ml	ELISA	BD

Sekundäre Antikörper

α-Kaninchen Alexa 488	Ziege	20µg/ml	IF	Invitrogen
α-Ratte Texas Red IgG (H+L)	Ziege	20µg/ml	IF	Invitrogen
α-Ratte Alexa 488 IgG (H+L)	Ziege	20µg/ml	IF	Invitrogen
Streptavidin PerCP, PE		1:100	FACS, IF	BD
Streptavidin HRP		1:2000	ELISA	Amersham

2.1.7 Software

AxioVision Rel. 4.6	Zeiss, Göttingen
Gen5	Biotek, Bad Friedrichshall
FlowJow 7.5	TreeStar, Ashland, USA
GraphPad Prism 4	GraphPad, La Jolla, USA

2.1.8 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden 6-12 Wochen alte Mäuse verwendet, die im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich im Tierhaus des IUF an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH gehalten und gezüchtet wurden. Versuche wurden an CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen durchgeführt, die für 8 Generationen auf den BALB/c- bzw. C57BL/6-

Hintergrund zurückgekreuzt wurden [Alferink et al., 2003]. EGFP cDNA im murinen *ccl17* Locus führt zur Expression von EGFP anstelle von CCL17. CCL17E/+ Mäuse produzieren etwa die Hälfte der normalen Menge an CCL17, während CCL17E/E Mäuse kein CCL17 produzieren (CCL17 *knockout* Mäuse). Des Weiteren wurden C57BL/6- sowie BALB/c-Wildtypmäuse verwendet, die von Harlan-Winkelmann erworben und im Tierhaus des IUF gezüchtet wurden.

Narkosen erfolgten durch Isofluran-Inhalation. Versuchstiere wurden am Ende eines Experimentes mittels CO_2 getötet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellzahlbestimmung durch Trypanblau-Vital-Färbung

Die zu quantifizierenden Zellen wurden in ein definiertes Volumen an PBS bzw. Medium aufgenommen. Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnung dieser Zellsuspension in Trypanblau angesetzt, wovon etwa 10µl in eine Neubauer Zählkammer überführt wurden. Tote Zellen wurden blau angefärbt, während lebende Zellen ungefärbt blieben. Die Neubauer Zählkammer besitzt eine Markierung, die in vier Quadranten aufgeteilt ist. Jeder Quadrant besteht aus 16 Kleinquadraten. Einer der vier Quadranten wurde ausgezählt und die Gesamtzellzahl folgendermaßen bestimmt:

Zellzahl pro ml = Mittelwert/Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10^4

Gesamtzellzahl = Zellzahl pro ml x Ausgangsvolumen der Zellsuspension

2.2.2 Isolierung von Zellen aus der Haut

Hautstücke wurden für wenige Sekunden in 70% Ethanol getaucht und dann kurz in sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Unterhautfettgewebe mit einem Skalpell entfernt. Die Hautstücke wurden bei 37°C mit der Dermisseite nach unten schwimmend auf 0,25% Trypsin/PBS inkubiert, sodass die Epidermis trocken blieb. Nach zwei Stunden wurde die Epidermis von der darunter liegenden Dermis getrennt, mit einem Stempel zerdrückt und die einzelnen Zellen mechanisch durch starkes Resuspendieren in Flüssigkeit aus ihrem Verbund herausgelöst. Die Zellen wurden durch ein Nylonsieb gegeben, bei 1200rpm (300 g) 8 Minuten abzentrifugiert und in ein definiertes Volumen von PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen unter Anwendung der Trypanblau-Färbung gezählt.

Für den Verdau der Dermis wurde eine Lösung, bestehend aus 10ml PBS, 0,5mg/ml Kollagenase P, und 500 Units DNase I angesetzt. Die Dermis wurde darin für 1h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Resuspendieren mit einer Pipette vereinzelt, anschließend durch ein Nylonsieb gegeben und bei 1200rpm (300 g) 8 Minuten

abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen unter Anwendung der Trypanblau-Färbung gezählt.

2.2.3 Isolierung von Zellen aus Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden in 1ml PBS zusammen mit 1mg/ml Kollagenase D und 300 U/ml DNaseI für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zuvor wurden die LK mit einer Pinzette punktiert bzw. mit einem Stempel angedrückt. Kollagenase ist ein Enzym, das speziell Peptidbindungen der Kollagenfasern zerstört und somit die Vereinzelung der Lymphknotenzellen ermöglicht. Anschließend wurden die Zellen mit einem Stempel weiter zerdrückt und die Zellen durch schnelles Resuspendieren der Suspension mechanisch vereinzelt. Die Zellen wurden durch ein Nylonsieb gegeben, bei 1200rpm (300 g) 8 Minuten abzentrifugiert und anschließend in einem definierten Volumen von PBS unter Anwendung der Trypanblau-Färbung gezählt.

2.2.4 Anreicherung mit einem Dichtegradienten

Die Anreicherung von DC aus dem LK wurde nach dem Protokoll von Ruedl et al. durchgeführt [Ruedl et al., 1996]. Es wurde der Dichtegradient von OptiPrep™ verwendet. Dafür wurde die Gradientenlösung mit der darunter liegenden Zellsuspension für 15 min und *600g* bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die angereicherten DC befanden sich in der zweiten Phase und konnten leicht abgenommen und in PBS gewaschen werden.

2.2.5 Generierung dendritischer Zellen aus Knochenmark

Das verwendete Protokoll ist eine modifizierte Version von Lutz et al. [Lutz et al., 1999] Femur und Tibia von CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) wurden von Geweberesten befreit und die Knochen mit Hilfe einer PBS gefüllten Spritze durchspült. Das Spülen erfolgte solange, bis die Knochen die innere rötliche Färbung verloren hatten. Die

Zellen wurden in einem 50ml Falconröhrchen aufgefangen, bei 1200rpm (300 g) 8 Minuten abzentrifugiert und anschließend in ein definiertes Volumen von Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde unter Verwendung einer Trypanblau-Färbung ermittelt. 5x105 Zellen/ml wurden in 10ml Medium und 2% Überstand einer GM-CSF-transfizierten Zelllinie (X63Ag865) bei 37°C in Petrischalen (Greiner) kultiviert. An Tag drei wurden die Zellen mit 10ml frischem Medium und 4% GM-CSF-Überstand gefüttert. An Tag 6 wurden die nicht-adhärenten Zellen durch leichtes Resuspendieren mit der Pipette von den Petrischalen geerntet. Die Zellen wurden in ein 50ml Falconröhrchen überführt und bei 1200rpm (300 g) acht Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung der Trypanblau-Färbung gezählt.

Für die Generierung von reifen DC wurden an Tag 6 die nicht-adhärenten DC geerntet. Die Zellen wurden mit oder ohne LPS (1µg/ml) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Petrischalen für 5 min auf Eis gestellt und die Zellen durch Abspülen geerntet.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Die FACS-Färbung (FACS = fluorescence activated cell sorting) wurde in speziellen FACS-Röhrchen (Falcon) durchgeführt, die während der Durchführung auf Eis gelagert wurden. Die eingesetzten Antikörper und Sekundärfarbstoffe wurden in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Antikörper wurden vor jeder Färbung in PBS verdünnt, wobei bei gleicher Färbung mehrerer Proben ein Mastermix vorbereitet wurde. Zu Beginn wurden $1x10^6$ bis $3x10^6$ Zellen pro FACS-Röhrchen aliquotiert und bei 1200rpm (300 g) Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in 25µl PBS mit α-Maus CD16/CD32 Antikörper (Fc-Block) aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche der Zellen zu blockieren. Anschließend wurden weitere 25µl PBS mit der doppelten Konzentration der gewünschten Antikörper zugefügt. Somit wurden die Zellen in einem Volumen von 50µl in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen 20 Minuten auf Eis gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und bei 1200rpm (300 g) fünf Minuten abzentrifugiert. Kam ein Biotin-gekoppelte Erst-Antikörper zum Einsatz, war eine weitere Inkubation der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Reagenz erforderlich. In dem Fall wurden die Zellen weitere 20 Minuten auf Eis

mit dem an Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper inkubiert. Schließlich wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 1ml PBS gewaschen und nach dem Zentrifugieren in 100-200µl PBS aufgenommen. Fixiert wurden die Zellen mit 1% PFA in PBS wenn der Zeitpunkt der Messung nicht direkt im Anschlus erfolgen konnte. Gemessen wurden die Zellen am FACSCalibur und die Daten mit Flow-Jo Software (Tree Star Inc., Ashland) analysiert.

2.2.7 Intrazelluläre Färbung:

Nachdem die gewünschten Epitope der Zelloberfläche gefärbt wurden, erfolgte die Fixierung der Zellen mit 1% PFA/PBS und ein Waschritt mit 0.5% Saponin in 1% BSA/PBS. Die FACS Antikörper für die intrazelluläre Färbung wurden auch mit 0.5% Saponin in 1% BSA/PBS verdünnt. Die Zellen würden mit dieser Antikörperlösung für 15 min auf Eis inkubiert, gewaschen und am FACS analysiert.

2.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Verwendet wurden spezielle ELISA-Flachboden-Mikrotiterplatten (Microlon 96W) von der Firma Greiner.

2.2.8.1 Gesamt-IgE-ELISA:

Die Flachboden-Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit 2µg/ml eines gereinigten (purified) Ratte α-Maus-IgE-Antikörper in PBS beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten drei Mal mit PBS-Tween 20 (0.05%) gewaschen und ausgeschlagen, bis der Waschpuffer entfernt war. Unspezifische Bindungen wurden mit 1% BSA/PBS für 2h bei RT blockiert. Als Standard wurde gereinigtes Maus-IgE verwendet. Proben wurden pur eingesetzt und auch 1:2 in einer Verdünnungsreihe in 1% BSA/PBS weiter verdünnt. Daraufhin wurden die Platten über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten wieder drei Mal gewaschen und ausgeschlagen. Zur Detektion wurde ein Biotin-gekoppelter Ratte α-Maus-IgE-Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt.

Auch dieser wurde in 1% BSA/PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 2h. Daraufhin wurden die Platten ein weiteres Mal gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurden die Platten mit HRP-gekoppeltem Streptavidin (1:2000 in 1% BSA/PBS) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurden Peroxidase-Substrat pro Well zugegeben und solange inkubiert, bis eine angemessene Blaufärbung erkennbar war. Daraufhin wurde eine 1M H_2SO_4-Lösung dazugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Absorption wurde mittels automatischen ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 570nm gemessen. Antikörperkonzentrationen wurden im Vergleich zum internen Standard mittels Gen5-Programm kalkuliert.

2.2.8.2 OVA-spezifisches IgG1 bzw. IgG2a:

Die Waschschritte wurden wie in dem oben beschriebenen IgE-ELISA eingehalten.
Die Flachboden-Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit 100µg/ml OVA in PBS beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten drei Mal mit PBS-Tween 20 (0.05%) gewaschen und ausgeschlagen, bis der Waschpuffer entfernt war. Unspezifische Bindungen wurden mit 1% BSA/PBS für 2h bei RT blockiert. Als Standard wurde Serum von OVA-sensibilisierten Wildtypmäusen verwendet. Für die späteren Auswertungen wurden den Verdünnungen Units zugeordnet, da die exakte Konzentration des Serums nicht bekannt war. Proben wurden pur sowie in weiteren Verdünnungen inkubiert. Für die Detektion wurden Biotin-gekoppelte Ratte α-Maus-IgG1- bzw. Ratte α-Maus-IgG2a-Antikörper verwendet, die in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt wurden und für 2h bei RT inkubierten. Anschließend wurden die Platten mit HRP-gekoppeltem Streptavidin (1:2000 in 1%BSA/PBS) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde das Peroxidase-Substrat pro *well* zugegeben und solange inkubiert, bis eine angemessene Blaufärbung erkennbar war. Daraufhin wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption mittels automatischen ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 570nm gemessen. Antikörperkonzentrationen wurden im Vergleich zum internen Standard mittels Gen5-Programm kalkuliert.

2.2.9 Anfertigen von Gefrierschnitten

Die Hautproben wurden in Einfriermedium eingebettet und bei -80°C gelagert. Um die eGFP Expression im Gewebe zu erhalten, wurden die Hautstückchen nach der Abnahme für 3h in 4% PFA eingelegt (bei Raumtemperatur). Es folgte die Inkubation in 5% Sucrose und 10% Sucrose für jeweils eine Stunde. Die Lagerung in 20% Succrose erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Proben wurden dann in Einfriermedium eingebettet und bei -80°C aufbewahrt. Es wurden 7-10µm dicke Gefrierschnitte am Kryostat hergestellt, auf Objektträgern luftgetrocknet und in eiskaltem Aceton fixiert. Die Objektträger wurden bis zur histologischen Färbung bei -20°C in speziellen Objektträgerkästen aufbewahrt.

2.2.10 Histologie

Die Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:
Die Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Da die Schnitte während der Lagerung bei -20°C Feuchtigkeit aufgenommen haben, mussten die Schnitte nun entwässert werden. Hierfür wurden sie für 10 min bei RT in Aceton/Methanol (1:1) inkubiert und anschließend an der Luft getrocknet. Nach kurzem Rehydrieren in destilliertem Wasser wurden die Objekträger für 10 min in Hämatoxylin-Lösung gestellt und anschließend mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für wenige Sekunden in 1% HCl / 70% Ethanol (EtOH) differenziert und erneut für mindestens 10 min in Leitungswasser gebläut. Als nächstes wurden die Schnitte für 30 Sekunden in alkoholisches Eosin gehalten. Die Differenzierung erfolgte dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%, 95% und 100% EtOH und schließlich in Xylol. Die Objektträger wurden kurz an der Luft getrocknet, mit Entellan eingedeckelt und anschließend unter dem AxioCamMR3 Mikroskop von Zeiss bei 200facher Vergrößerung fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der AxioVision Rel. 4.6 Software von Zeiss.
Die in 4% PFA und dann in Paraffin eingebettete Haut wurde in der Dermatologie der Uniklinik Düsseldorf geschnitten und mit H&E und Giemsa gefärbt. Mastzellen wurden in 6-8 zufällig gewählten Bereichen auf einem Schnitt gezählt und pro Milimeter Epidermis berechnet. Eosinophile wurden pro Durchlichtbild bei einer 40x Vergrößerung gezählt.

2.2.11 Immunfluoreszenz

Die Objektträger wurden bei RT aufgetaut, für 10 min bei RT in Aceton inkubiert und anschließend an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden daraufhin mit einem ImmEdge Stift umrandet. Die Objektträger wurden kurz in PBS rehydriert und unspezifische Bindungen für 30 Minuten mit 100µl/Schnitt 10% FKS, 1% Ziege und 1% Rattenserum, gefogt von einem Avidin D- und Biotin-Block (Vector Labs, Burlingame, USA) abgesättigt. Der erste Antikörper: Ratte α-Maus-MHCII, Ratte α-Maus-CD4 oder Ratte α-Maus-FcεRIα, sowie Hamster α-Maus-CD11c wurde 1:100 in einem Volumen von 100µl/Schnitt über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal in PBS gewaschen und mit dem Sekundärantiserum Ziege α-Ratte Texas Red für 2h bei RT gefärbt. Nur die CD11c Färbung benötigte ein abweichendes Protokoll: Es folgte nach dem ersten Antikörper die Inkubation mit dem biotinylierten Maus α-hamster Cocktail. Die biotinylierten Stellen von CD11c und FcεRIα wurde mit Streptavidin FITC detektiert. Schließlich wurden etwa 200µl Mowiol auf jeden Objektträger pipettiert, die Schnitte mit einem Deckgläschen eingedeckelt und anschließend unter dem AxioVision Mikroskop von Zeiss bei 200facher Vergrößerung fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der AxioVision Rel. 4.6 Software von Zeiss.
Für die Detektierung von grün fluoreszierenden Zellen in der Haut wurden die in 4% PFA fixierten Hautproben für 3h in einem Sucrosegradienten stabilisiert und bei -80°C eingefroren. Die 7-10 µm dicken Gefrierschnitte wurden in eiskaltem Aceton fixiert. Nachdem die unspezifischen Bindungen mit 1% BSA/PBS abgesättigt wurden, wurden die Schnitte mit Kaninchen anti-GFP IgG (Invitrogen) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Schnitte wurden dann gewaschen und mit Alexa 488 Ziege anti-Kaninche IgG (Invitrogen) gefärbt. Nach dem Waschen und Eindeckeln wurden die Schnitte mit AxioCamMR3 fotografiert und mit der Software AxioVision Rel. 4.6 (Zeiss) ausgewertet.

2.2.12 Haptenapplikation

DNFB: CCL17E/+ Mäuse und CCL17E/E Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) wurden durch Isofluran-Inhalation narkotisiert und die dorsale Seite der Maus rasiert. Es folgte die Applikation von 0.5% DNFB in Aceton/Olivenöl (5:1) oder dem Lösungsmittel (je 80µl). 2 und

4 Tage später wurden die axillären, brachialen, und inguinalen LK entnommen und analysiert.

FITC: C57BL/6 Mäuse wurden ohne Narkose auf der ventralen Seite rasiert und 200µl einer 0.5%igen FITC in Aceton-Dibutylphtalat-Lösung wurden aufgetragen. Nach 24, 48 und 96h wurden die axillären, brachialen und inguinalen LK entnommen. Als interne Negativkontrolle dienten die distalen mesenterialen LK.

2.2.13 Mausmodell für Atopische Dermatitis (AD)

Im Mausmodell der atopischen Dermatitis wurden die Tiere, wie in dem Protokoll von Spergel et al und Wang et al [Spergel et al., 1998; Wang et al., 2007] beschrieben, wiederholt mit OVA epikutan sensibilisiert bis eine chronische allergische Reaktion entstand. Die Tiere wurden dazu kurzfristig mit einer Isofluran Inhalationsnarkose betäubt, am Rücken rasiert, und die zu behandelnde Hautstelle wurde 4mal durch Aufkleben und Abziehen eines Filmstreifens (Tegaderm tape, 3M) irritiert. Anschließend wurde ein mit OVA (100µl einer 0.1%igen Lösung in 0,9% NaCl) getränktes Pflaster (1x1 cm) aufgeklebt. Kontrolltiere erhielten ein mit 0.9% NaCl getränktes Pflaster. Der gleiche Vorgang wurde vier Tage später wiederholt. Das Pflaster wurde nach einer Woche entfernt und die Behandlung für zwei Wochen unterbrochen. Die Sensibilisierung wurde insgesamt noch zweimal wiederholt, so dass die Mäuse dreimal für eine Woche dem Allergen exponiert waren. 50 Tage nach Beginn des Experimentes wurden Hautbiopsien, sowie drainierende LK und das Serum analysiert.

2.2.14 Blutabnahme und Serumgewinnung

Die Mäuse wurden am Tag 50 der AD-Behandlung getötet und der Bauchraum unterhalb des Zwerchfells geöffnet. Mit einer Schere wurde die Aorta durchtrennt und das, in den Bauchraum fließende Blut, mit einer Spritze aufgezogen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Blut wurde 1h bei RT zur Koagglutation gelagert und anschließend bei 13.000 rpm (16.000 g) in der Tischzentrifuge von Eppendorf (Centrifuge 5415D) für 10 Minuten

zentrifugiert. Das nun klare Serum wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.15 In vitro Experimente zur Untersuchung der Wanderungsfähigkeit von DC

2.2.15.1 Transwell-Migrationstest

KM-DC wurden nach 2.2.5. generiert und am Tag 6 wurden die nicht adhärenten Zellen geerntet und über Nacht mit 1µg/ml E.coli LPS aktiviert. Am Tag 7 wurden die Zellkulturschalen für 5 min auf Eis gestellt und die Zellen dann durch mehrmaliges Abspülen mit eiskaltem PBS geerntet. Die Migration der DC wurde in 24-Loch Transwellplatten (Costar, Cambridge, MA, USA) untersucht. Die obere Kammer wurde mit $2x10^5$ Zellen aus der KM-Kultur in 300 µl RPMI-1640/ 0.5% FKS beladen. Die untere Kammer wurde dann mit 700 µl RPMI-1640/0.5% FKS gefüllt, dem 200ng/ml CCL19 oder CCL21 oder kein Chemokin zugefügt wurde. Nach 3h Inkubation bei 37°C wurde die Zellen gezählt.

2.2.15.2 3D Kollagengel Chemotaxis-Messung

Das Experiment wurde nach Friedl et al. mit folgenden Veränderungen durchgeführt. Kollagen I wurde mit 0.7% Natrium-bicarbonat (Invitrogen) und 1x MEM auf Eis zusammengegeben. KM-DC in RPMI 1640/0.5% FKS wurden vorsichtig in einem Verhältnis 2:1 dazu gefügt, sodass dies eine Kollagen Konzentration von 1.7 mg/ml mit 1.5x106 Zellen/ml Gel ergab. Die Kollagen-Zell-Lösung wurde Chemotaxis-Kammern, welche mit Dentalwachs auf Objektträgern geformt wurden, gegossen und für 90 min bei 37°C und 5% CO2 zum polymerisieren inkubiert. Danach wurden 600 ng/ml CCL19 auf das Gel gegeben und die Kammer in eine klimatisierte Kammer mit 37°C/5% CO2 gestellt. Eine CCD-1300 Kamera (Vosskühler, Osnabrück) wurde an das TE-Eclipse Mikroskop (Nikon, Japan) mit dem 10x Phasenkontrast Objektiv angeschlossen. Für 3h wurde alle 5 min ein Bild aufgenommen, welche später mit der ImageJ Software zu einem Film zusammengefügt wurden. Die Zusatzprogramme *Manual tracking* und *Chemotaxis and Migration* (Ibidi, Martinsried, Germany) erlaubten eine Auswertung der Aufnahmen.

2.2.16 RT-PCR

Die Hautbiopsien wurden in Kooperation mit H. Alenius und T. Savinko in Helsinki bearbeitet: Die gefrorenen Biopsien wurden in EUROzol (Euroclone, Milano, Italy) mithilfe des Ultra-Turrax T8 (IKA, Stauffen, Germany) homogenisiert. Die RNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach den Herstellerempfehlungen umgeschrieben.

Die mRNA Expressionsstärke der Zytokine wurde mit real-time quantitativer PCR (AbiPrism 7500 Fast RT PCR Sytem) bestimmt. PCR Primer und Proben von IL-4, IL-13, IL-17, IL-10, IL-1β, FoxP3, IFN-γ und 18S rRNA wurden von Applied Biosystems als vorgefertigte Reagenzien erworben. Die Ergebnisse wurden nach der Anleitung von Applied Biosystems berechnet und auf die endogene Kontrolle der 18S rRNA bezogen.

2.2.17 Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software, wenn nicht anders beschrieben, unter Verwendung des Student *t-Tests* analysiert. Einige Ergebnisse wurden mit dem Mann-Whitney U-Test analysiert. Diese wurden dann in der Bildunterschrift extra benannt. Der p-Wert wird in den Graphen als Sternchen dargestellt: ***p<0.001; **p<0.01 und *p<0.05

3 Ergebnisse

3.1 Die Expressionsstärke von CD24a unterscheidet LZ von dDC

3.1.1 Abbau des CD11c Epitops durch Enzyme

Immunantworten der Haut werden durch antigenpräsentierende Zellen vermittelt, die in diesem Grenzorgan lokalisiert sind. Während in unbehandelter Haut die DC der Epidermis nur die LZ sind, weist die Dermis hingegen eine große Diversität an DC auf. In der Dermis transmigrieren und residieren LZ, sowie verschiedene Subpopulationen an dDC, welche sich durch unterschiedliche Oberflächenrezeptoren und putative unterschiedlichen Funktionen auszeichnen. Um die komplexen immunologischen Prozesse während Immunreaktionen der Haut verstehen zu lernen, ist es essentiell die DC aus der Haut zu isolieren und zu charakterisieren. Eine übliche Methode erfordert zunächst einen enzymatischen Verdau mit Trypsin. Dies ermöglicht die Trennung der Epidermis von der Dermis. Während die Epidermis sofort zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet werden kann, benötigt die Dermis einen weiteren enzymatischen Verdau mit Kollagenase P. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass diese Enzyme oft Epitope auf der Zelloberfläche zerstören. Somit wird die Detektion von verschiedenen Oberflächenmarkern mit Antikörperfärbungen oft unmöglich. Schon die Inkubation mit Trypsin führte innerhalb weniger Minuten zu einem Abbau des CD11c-Epitops von der Zelloberfläche. Dies konnte mit einer Kinetik an DC aus der Milz aufgezeigt werden (Abb. 4A). Auch die dDC ließen sich nach Inkubation mit den Enzymen nicht mehr mit Antikörpern gegen CD11c Epitops anfärben (Abb. 4B). Der Verdau der Milzzellen hingegen mit Kollagenase D hatte keinen Einfluss auf die CD11c Expression. Dies zeigte, dass nicht alle Enzyme den Abbau von CD11c bewirken. Jedoch sind frisch isolierte Haut-DC nicht mit Hilfe von CD11c zu identifizieren. Weiterhin ist bekannt, dass MHCII nicht durch die Enzyme Trypsin und Kollagenase P betroffen ist. Bisher war dies einer der wenigen Marker mit denen man die verschiedenen Populationen von DC in der Haut unterscheiden konnte. Als weiterer Marker wird oft CD24a (HSA) hinzugezogen, da nur LZ CD24a sehr hoch

exprimieren und auch dieses Epitop durch enzymatischen Verdau nicht zerstört wird. Die Kombination dieser beiden Färbungen in der Epidermis erlaubte eine distinkte Abgrenzung der LZ von den anderen epidermalen Zellen. Bei der Anwendung dieser Färbung bei einer dermalen Zellsuspension zeigte sich, dass hier nun drei distinkte Populationen erscheinen: MHCII+ CD24a+, sowie MHCII+ CD24a-negative und MHCII-negative CD24a-negative Zellen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde geprüft, ob es eine differentielle Expression von CD24a zwischen dDC und LZ gibt, die sich dann als Unterscheidungsmarker dieser beiden DC-Typen sowohl in der Peripherie als auch in den sekundären lymphatischen Organen, eignen könnte.

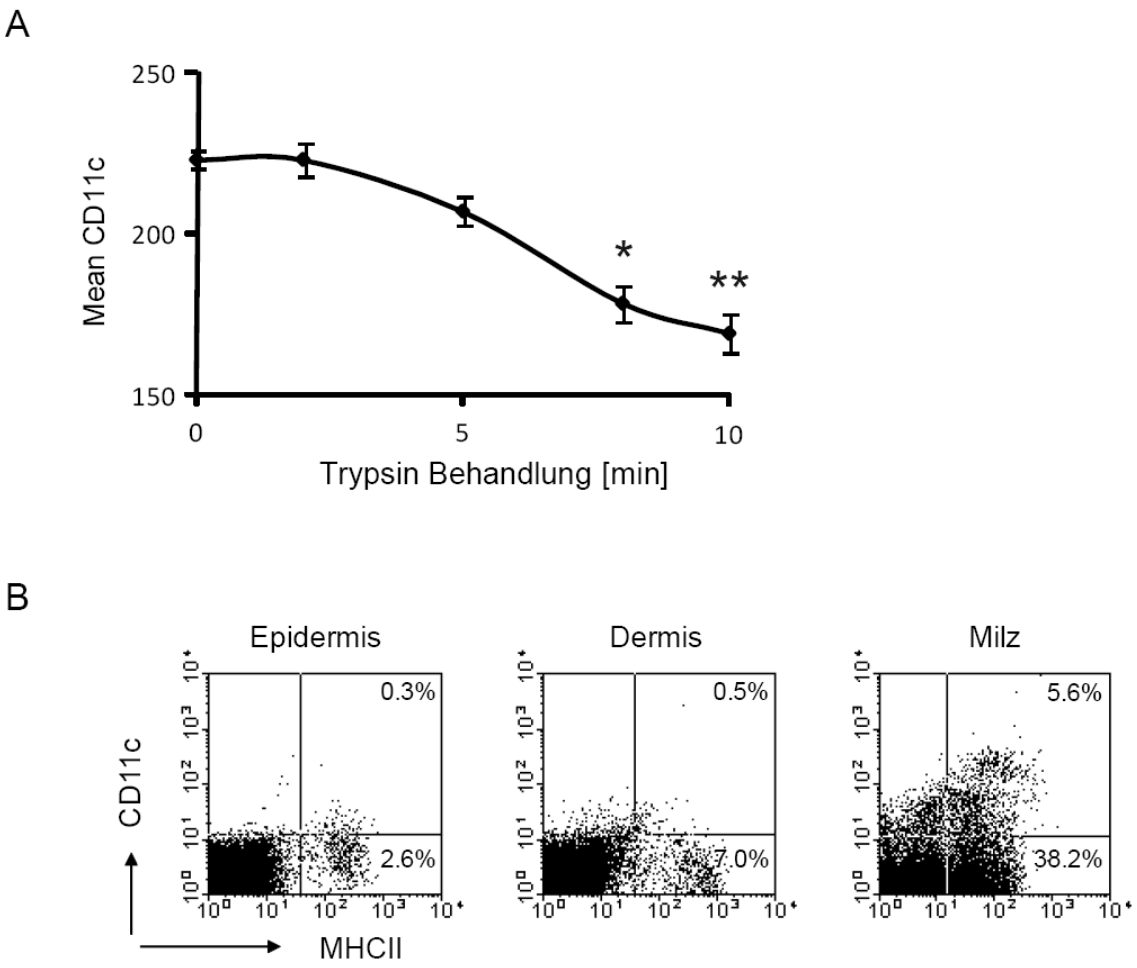
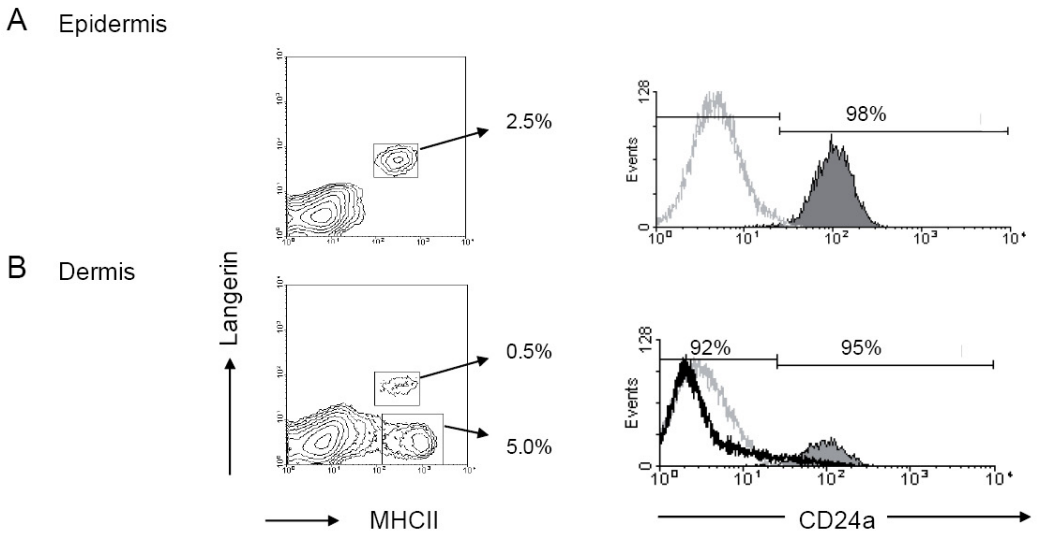


Abbildung 4: Die Inkubation mit Trypsin und Kollagenase P führt zum Abbau des CD11c Epitops.

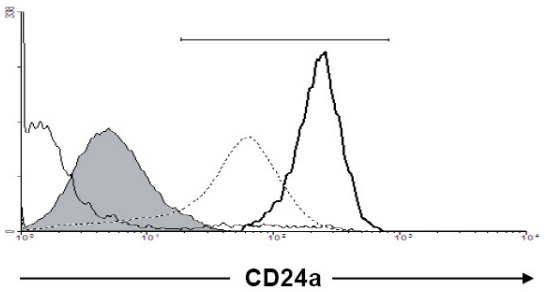
Milz DC wurden mit Trypsin inkubiert. Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die Expression von CD11c am FACS gemessen (A). Die frischen Zellsuspensionen der Epidermis und Dermis wurden mit anti-CD11c gefärbt und am FACS gemessen. Die Expression von CD11c wurde mit Milz-DC verglichen, die nur mit Kollagenase D und DNase I behandelt wurde (B).

3.1.2 Bei epidermalen LZ korreliert die CD24a Expression mit der von Langerin

LZ sind die DC der Epidermis, die durch Birbeck Granula gekennzeichnet sind. Diese Tennisschläger-förmigen Organellen sind am Prozess der Phagozytose beteiligt. Langerin ist ein Lektin, funktionell ein Mannoserezeptor ist und konstitutiv innerhalb der Birbeck Granula exprimiert. Daher dient Langerin als Marker für LZ.



C Epidermis



Schattierter Graph	= Isotyp Kontrolle		
Schwarze Linie	= MHCII$^+$ CD3$^-$	→ LZ	99,9%
Gepunktete Linie	= MHCII$^-$ CD3$^-$	→ Keratinozyten	82%
Dünne Linie	= MHCII$^-$ CD3$^+$	→ T-Zellen	12%

Abbildung: 5 CD24a Expression in der Haut

Die Epidermis und Dermis wurden durch einen Trypsinverdau getrennt und die jeweiligen Einzelzellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch analysiert. (A) Die epidermalen Zellen wurden mit

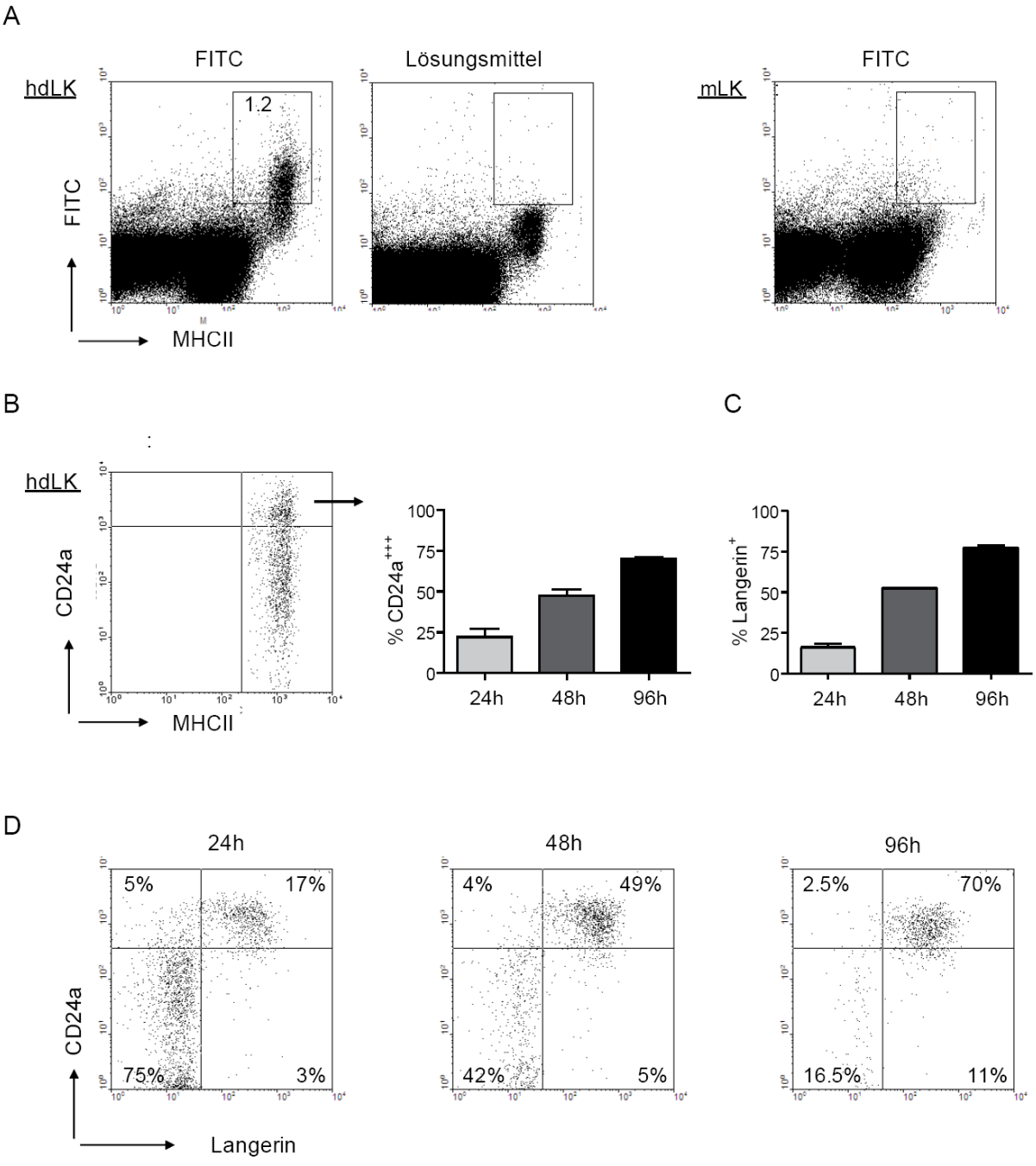
MHCII und Langerin gefärbt. Doppelt positive Zellen wurden weiter auf eine CD24a Expression analysiert (gefüllter Graph). (B) Die CD24a Expression in der Dermis wurde von der MHCII und Langerin doppelt positiven Population (gefüllter Graph), sowie von der MHCII+ Langerin- Population (schwarze Linie) analysiert. Die graue Linie repräsentiert die Isotypkontrolle. Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob eine hohe CD24a Expression ebenso ein Merkmal von LZ ist, wurde die Korrelation der Langerinexpression mit CD24a analysiert. Dafür wurde eine Einzelzellsuspension epidermaler Zellen mit MHCII, Langerin und CD24a gefärbt. Wie in Abb. 5A zu sehen ist, sind alle MHCII+Langerin+ Zellen, welche LZ sind und ca. 3% der epidermalen Zellen ausmachen, ebenso positiv für CD24a. Wie erwartet, gibt es keine MHCII+/ Langerin- Zellpopulation in der Epidermis. Es stellte sich aber die Frage, ob andere Zellen innerhalb der Epidermis positiv für CD24a sind. Wie in Abb. 5C zu sehen ist, konnte für Keratinozyten und T-Zellen in unbehandelter Haut gezeigt werden, dass sowohl 80% der Keratinozyten als auch 12% der CD3+ T-Zellen positiv für CD24a sind (Abb. 5C). Allerdings lag deren Expressionsstärke deutlich unter der von den LZ. Die gleichzeitige Färbung für MHCII und CD24a erlaubt damit die Identifizierung der LZ in der Epidermis. Die Dermis enthält im Gegensatz zur Epidermis viele verschiedene DC-Populationen. Es konnten MHCII+ Langerin+ DC, welche die LZ und die Langerin+ dDC repräsentieren, gefärbt werden. Sie machen mit 0.5% einen nur sehr kleinen Anteil der Dermiszellen aus. Die MHCII+ Langerin- Population ist mit 5% deutlich größer. Wie in Abb. 5B zu sehen ist, sind alle MHCII+ Langerin+ Zellen auch CD24a+ (gefüllter grauer Graph). Langerin-negative Zellen exprimieren allerdings auch kein CD24a. Dies bedeutet, dass der Oberflächenmarker CD24a für Langerin+ Zellen spezifisch ist, und eine Färbung mit CD24a Antikörpern daher zur Unterscheidung von LZ und dDC der Dermis verwendet werden kann

3.1.3 Die CD24a Expression unterscheidet LZ von dDC im hdLK

Für das Verständnis von immunologischen Prozessen, die durch Haut-DC vermittelt wurden, ist die Unterscheidung der verschiedenen, in den hdLK einwandernden DC-Populationen essentiell. Bisher konnte nur der anti-Langerin Antikörper eindeutig LZ identifizieren. Dessen

Verwendung bedarf allerdings einer intrazellulären Färbung. Die LK Zellen müssen dafür fixiert werden, was eine Sortierung von lebenden Zellen unmöglich macht. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Oberflächenfärbung mit CD24a dazu eignet, ebenso wie in der Haut, LZ im hdLK zu identifizieren. Dafür wurden Wildtypmäuse mit dem fluoreszierenden Hapten FITC (Fluorescein-isothiocyanat) auf dem Abdomen bepinselt. Dies löst eine Aktivierung der DC in der Haut aus, was zu einer verstärkten Einwanderung von LZ und dDC aus der Haut in den hdLK führt. Die hdK wurden nach 24h entnommen und die Zellen mit Antikörpern gegen Langerin, MHCII und CD11c angefärbt. Wie in Abb. 6A zu sehen ist, besaßen ca. 1% der DC im hdLK eine sehr hohe MHCII Expression. Diese MHCII hoch-positiven DC könnten aus der Haut stammen, da diese Zellpopulation im mesenterialen LK nicht vorhanden war. Um dies genauer zu untersuchen wurde eine Lösung mit FITC auf dem rasierten Abdomen der Maus aufgetragen. Die DC der Haut nehmen das FITC auf, werden aktiviert und wandern in den nächst gelegenen LK ein. FITC ist ein grün-fluoreszierender Farbstoff, welcher im FACS zu detektieren ist. Es zeigte sich, dass nur die MHCII-hochpositiven Zellen auch FITC positiv waren. Eine zusätzliche Färbung mit CD24a ergab zwei Populationen: eine CD24a-hoch und eine CD24a-niedrig exprimierende Population, die jeweils auch MHCII hoch-positiv und FITC positiv war (Abb. 6B). Im Verlauf von vier Tagen stieg der Anteil der CD24a-hoch exprimierenden Zellen im LK auf 75% an. Mit diesem Anstieg korrelierte auch der Anteil der Langerin positiven Zellen auf 75% an (Abb. 6C). Eine Doppelfärbung für CD24a und Langerin bewies, dass die CD24a-hoch exprimierenden Zellen auch Langerin positiv waren. Die CD24a-niedrig exprimierenden Zellen waren hingegen Langerin negativ (Abb. 6D). In Abb. 6E ist das Färbemuster der Gesamt-LK Zellsuspension gezeigt. Die MHCII-hoch CD24a-hoch und die MHCII-hoch CD24a-niedrig/mittel-stark exprimierenden Zellen können demnach leicht unterschieden werden. Es konnte beobachtet werden, dass während der Reifung und Wanderung der dDC in den LK, die Expression von CD24a, im Vergleich zur Haut, heraufreguliert wurde. Dennoch bleibt die Expressionsstärke unter der von den LZ, so dass die beiden Zellpopulationen noch gut voneinander abgrenzbar sind. Allerdings haben auch die LZ im LK, im Vergleich zu den LZ in der Haut, eine erhöhte Expressionsstärke von CD24a, die mittlere Fluoreszenzintensität stieg von 100 auf 1.500 (Abb. 6G) an.


A
FITC
Lösungsmittel
FITC
hdLK
mLK
1.2
FITC
MHCII
B
C
hdLK
CD24a
MHCII
% CD24a+++
% Langerin+
100
75
50
25
0
24h
48h
96h
D
24h
48h
96h
5%
17%
75%
3%
4%
49%
42%
5%
2.5%
70%
16.5%
11%
CD24a
Langerin

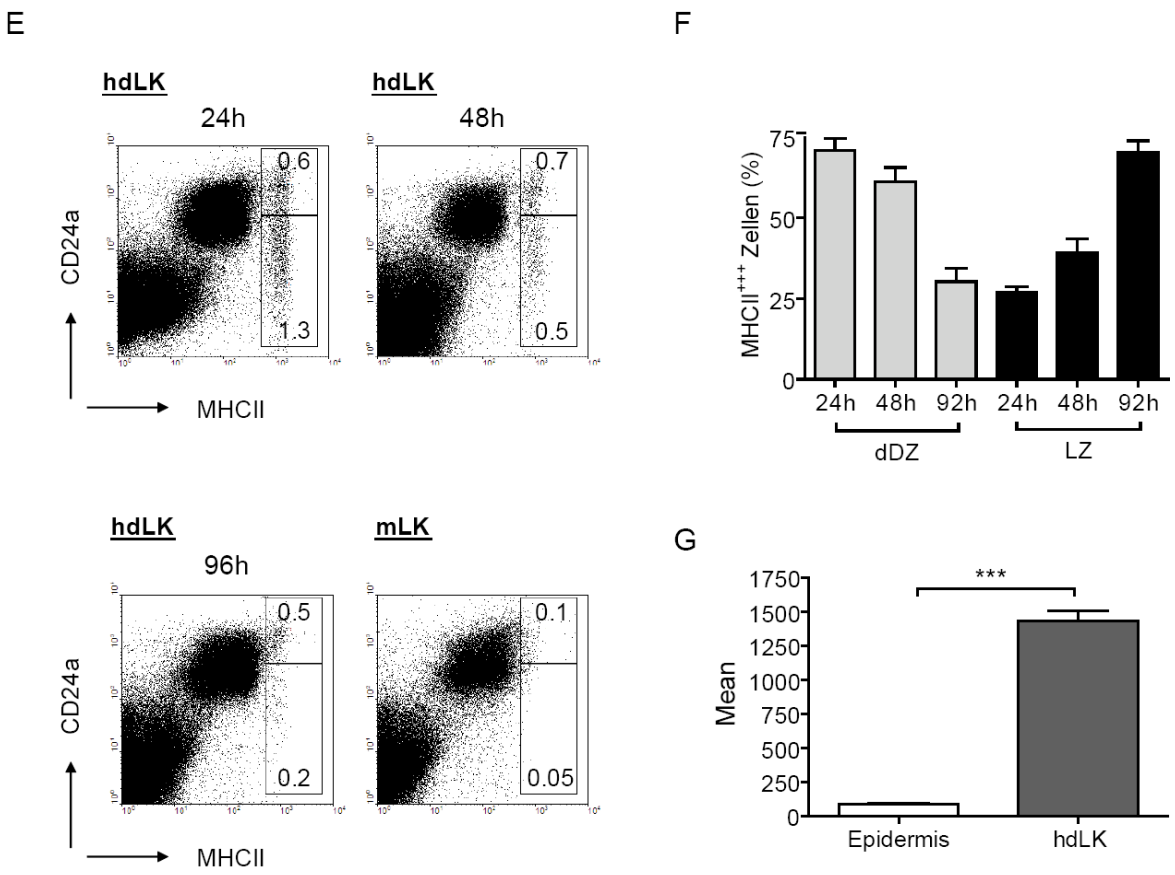


Abbildung 6: CD24a Expression von DC der Haut im drainierenden LK (hdLK).

Die Mäuse wurden auf der ventralen Seite rasiert und mit FITC oder Lösungsmittel (Aceton/Olivenöl) bepinselt. 24, 48 und 96h nach der Applikation wurden die hdLK und mesenterialen LK entnommen und am FACS analysiert. (A) Die aus der Haut kommenden DC können als FITC+ gefärbte MHCII-hoch exprimierende DC identifiziert werden. Repräsentativ werden Dot Plots der LK-Zellsuspensionen 24h nach FITC oder Lösungsmittelapplikation gezeigt. Als Negativkontrolle dienen mesenteriale LK (rechts). (B) Die FITC+ MHCII-hoch exprimierenden Zellen wurden auf die Expression von CD24a untersucht. Der Dot Plot zeigt repräsentativ das CD24a Färbemuster von MHCII-hoch exprimierenden Zellen 24h nach FITC Applikation. Der prozentuale Anteil der CD24a-hoch exprimierenden Zellen wurde von allen Zeitpunkten berechnet (n=3). (C) Nach der Färbung der LK Zellen mit Langerin und MHCII wurde die Frequenz der Langerin+ Zellen innerhalb der FITC+ MHCII-hoch exprimierenden Fraktion für alle Zeitpunkte der FITC Applikation berechnet. (D) Die Dot Plots sind repräsentativ für die Expression von CD24a und Langerin der FITC+ Zellen im hdLK zu allen genannten Zeitpunkten. Die Frequenzen in der Abbildung sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (E) Das Färbemuster der Gesamt-LK Zellsuspension wurde zu allen Zeitpunkten analysiert. Die MHCII und CD24a Expression, sowie auch die Verteilung der CD24a Expression innerhalb der MHCII-hoch exprimierenden Zellen wurde dargestellt. Eins von drei unabhängigen Experimenten ist hier gezeigt. In (F) ist die Frequenz der CD24a-niedrig/mittel-starken exprimierenden Zellen (dDC) und der CD24a-hoch exprimierenden Zellen (LC) nach FITC Applikation in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. (G) zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittelwert) von CD24a an, wobei LZ der Epidermis mit LZ des hdLK verglichen wurden. *** = P<0.0001.

3.1.4 Wanderungskinetik von CD24a-hoch experimentierenden DC, die in den LK einwandern

In der Vergangenheit gab es einige Arbeiten, die das Wanderungsverhalten der DC aus der Haut untersuchten. Sie konnten zeigen, dass aktivierte LZ nach 3-4 Tagen ihr Maximum im hdLK erreiche. dDC erreichen ihre maximale Menge im hdLK schon nach 1-2 Tagen [Kissenpfennig et al., 2005]. Es stellte sich die Frage, ob diese Beobachtungen unter der Verwendung von CD24a bestätigt werden können. Dazu wurden die Mäuse am Bauch rasiert und mit FITC bepinselt. Nach 24h, 48h und 96h wurden die drainierenden LK isoliert und die Expression von CD24a und Langerin auf den DC der hdLK analysiert. Wie in Abbildung 6C und D zu sehen ist, stieg die CD24a-hoch exprimierende, sowie die Langerin+ Population aller FITC+ MHCII-hoch Zellen im LK nach einem Tag auf ca. 25% an. Am vierten Tag war dieser Prozentsatz sogar auf 75% angestiegen. Im Gegensatz dazu nahm die Population von CD24a-niedrig/mittel-stark exprimierenden Langerin negativen Zellen nach 24h kontinuierlich ab (Abb. 6F). Diese Daten bestätigen zuvor veröffentlichte Ergebnisse von Migrationsstudien von LZ und dDCs [Kissenpfennig et al., 2005]. Zusammengenommen zeigen die Daten, dass die differentielle Expression von CD24a LZ von dDC im LK unterscheidet. Die LZ zeichnen sich durch eine hohe Expression der beiden Marker MHCII und CD24a aus, während die dDC unter den anderen MHCII+ Zellen im LK als MHCII-hoch CD24a-niedrig/mittelstark, zu identifizieren sind.

3.1.5 CD103 Expression und CD24a

In 3.1.2 konnte gezeigt werden, dass die Dermis aus Langerin+ LZ, sowie Langerin-negativen dDC besteht. Eine zusätzliche Färbung mit CD103 zeigte, dass die LZ in der Dermis (Population a, Abb. 7A) zu 50% CD103-positiv und zu 50% CD103-negativ sind (Abb. 7). Dermale Langerin+ Zellen exprimieren CD103, wobei epidermale und migrierende LZ und andere dDC CD103 negativ sind [Merad et al., 2008].

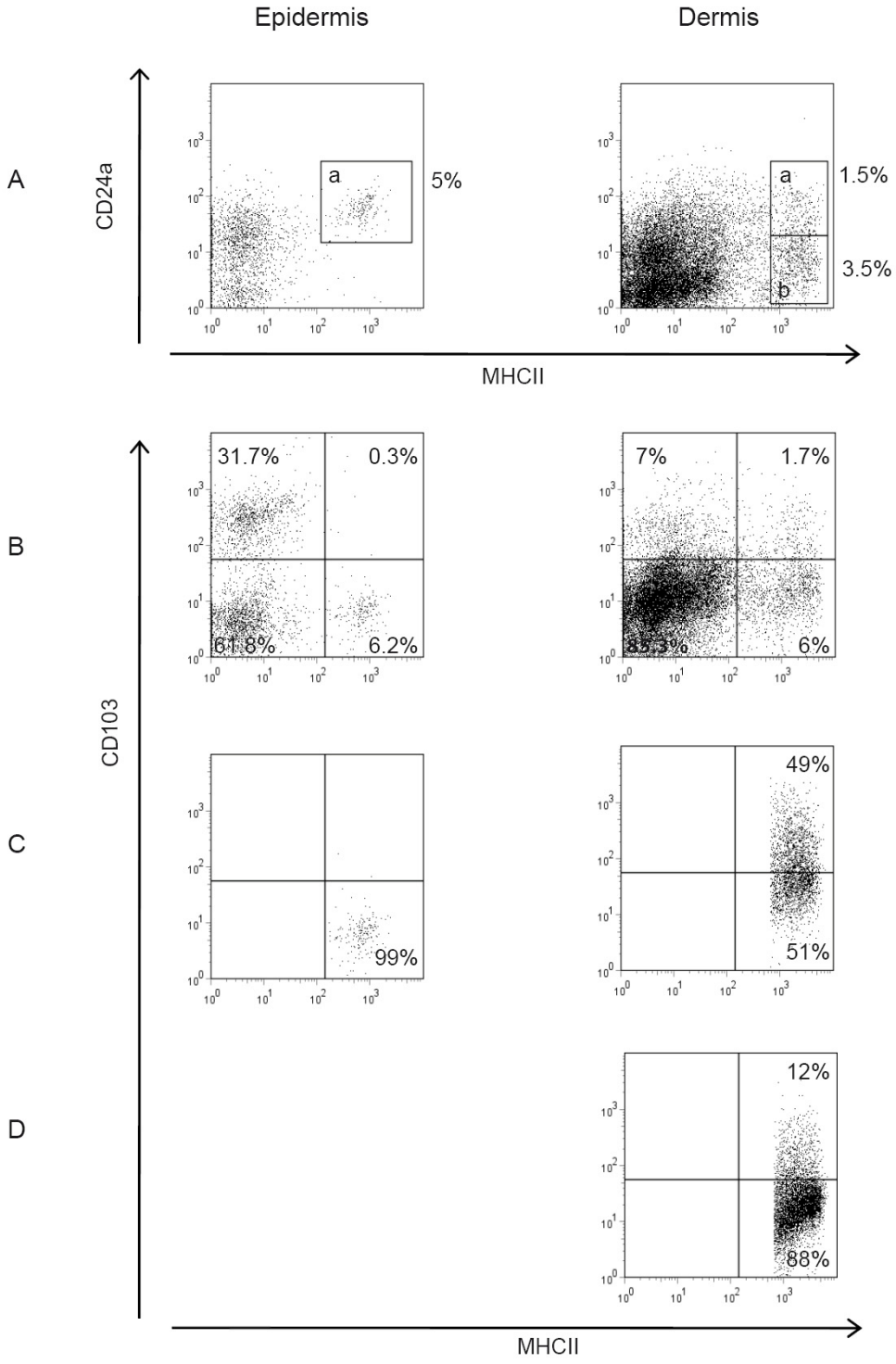


Abbildung 7: Expression von CD103 und CD24a in der Haut

Die Rückenhaut von C57BL/6 Mäusen wurde mit 0.25% Trypsin für 2h inkubiert, die Epidermis von der Dermis getrennt und die dermale Hautschicht für weitere 40 min mit Kollagenase P und DNaseI inkubiert. Die frischen epidermalen und dermalen Zellsuspensionen wurden mit MHCII und CD24a gefärbt und auf MHCII+ CD24a-hoch exprimierende Zellen (Population a = LZ) sowie auf MHCII+ CD24a-niedrig exprimierende Zellen

(Population b = dDC) gegatet. Die Expression von CD103 der ganzen Zellsuspension (B) und der LC (C) und dDC (D) wird gezeigt.

Das weist darauf hin, dass die CD24a-hoch Langerin+ DC Population (Abb. 7, Population a) in der Dermis aus den dermalen Langerin+ DC (CD103+) und den migrierenden LZ (CD103-) besteht. LZ in der Epidermis sind CD24a-hoch und CD103-negativ. Die dDC (Abb. 7, Population b) in der Dermis sind zu über 80% CD103-negativ.

Eine Färbung der DC im hdLK unter normalen Bedingungen zeigte, dass 33% der designierten LZ (Abb. 8B: CD24a-hoch exprimierende Zellen) auch CD103 exprimieren und daher zu den residenten dermalen Langerin+ DC gehören. Über 90% der dDC (Abb. 8B: CD24a-niedrig exprimierend) sind CD103-neagtiv im LK. Daher kann man schlussfolgern, dass eine Färbung mit anti-CD24a als auch mit anti-Langerin nicht zwischen den migrierenden CD103-negativen LZ und den residenten dermalen CD103+ DC unterscheiden kann.

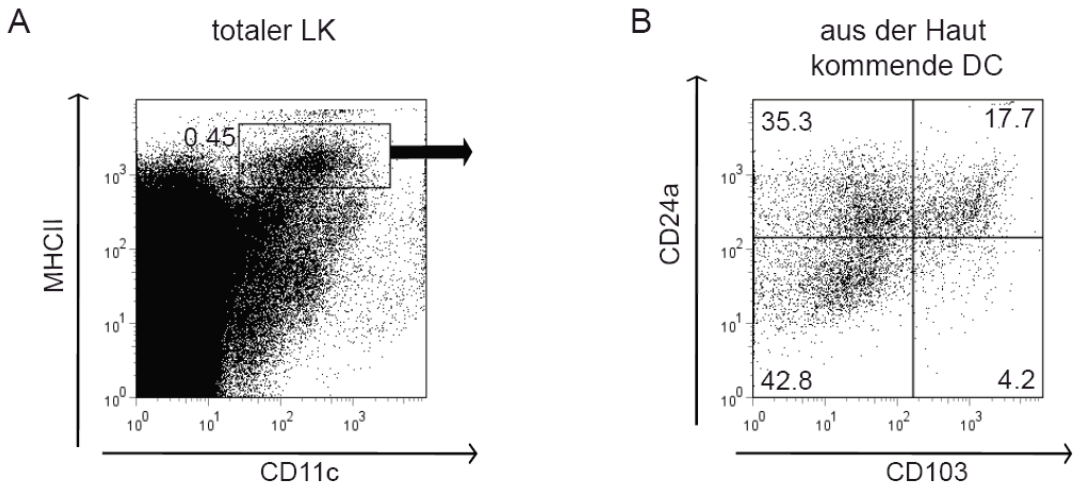


Abbildung 8:CD103 und CD24a Färbemuster im hdLK.

Die brachialen und inguinalen LK von C57BL/6 Mäusen wurden für CD24a, MHCII, CD11c und CD103 gefärbt. In (A) wurde in der gesamten LK Zellsuspension auf die DC, welche aus der Haut kommen (MHCII-hoch CD11c+) gegatet und auf CD24a und CD103 Expression untersucht (B). Die CD24a-hoch exprimierenden Zellen in (B) sind LZ und CD24a-niedrig exprimierende Zellen sind dDC.

3.1.6 CD24a Expression bei den aus CD8□+ DC im LK

In hdLK sind sowohl aktivierte DC zu finden, die nach Antigenstimulation dort eingewandert sind, als auch konstitutiv zirkulierende DC. Letztere exprimieren CD11c, CD8a und MHCII auf ihrer Zelloberfläche ([Carbone et al., 2004] und unsere eigenen Daten) und werden auch „die aus dem Blut stammenden DC“ (engl. blood derived DC) genannt. Einige von diesen Zellen können auch Langerin positiv sein [Douillard et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005]. Um festzustellen, ob deren Langerin Expression auch mit einer hohen Expression von CD24a korreliert, wurden die DC, durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert (Abbildung 9A). Dies war nötig, da die Langerin+ blood-derived DC eine sehr kleine Population im hdLK ausmachen. Nach der Anreicherung lag der Anteil an CD11c+ CD8□+ Zellen bei etwa. 3%. Davon waren 12% positiv für Langerin. Eine Färbung für CD24a und Langerin zeigte, dass alle aus dem Blut stammenden DC die Langerin+ sind, auch eine hohe CD24a Expression aufwiesen (grau-schattierter Graph in Abbildung 9B). Allerdings fanden wir auch CD24a-hoch exprimierende CD8a+ DC, die negativ für Langerin waren (dünne Linie). Es lässt sich schlussfolgern, dass CD24a sich nicht als Marker eignet um Langerin+ blood-derived DC zu identifizieren Allerdings korrelierte die Langerinexpression dieser Zellen mit CD24a.

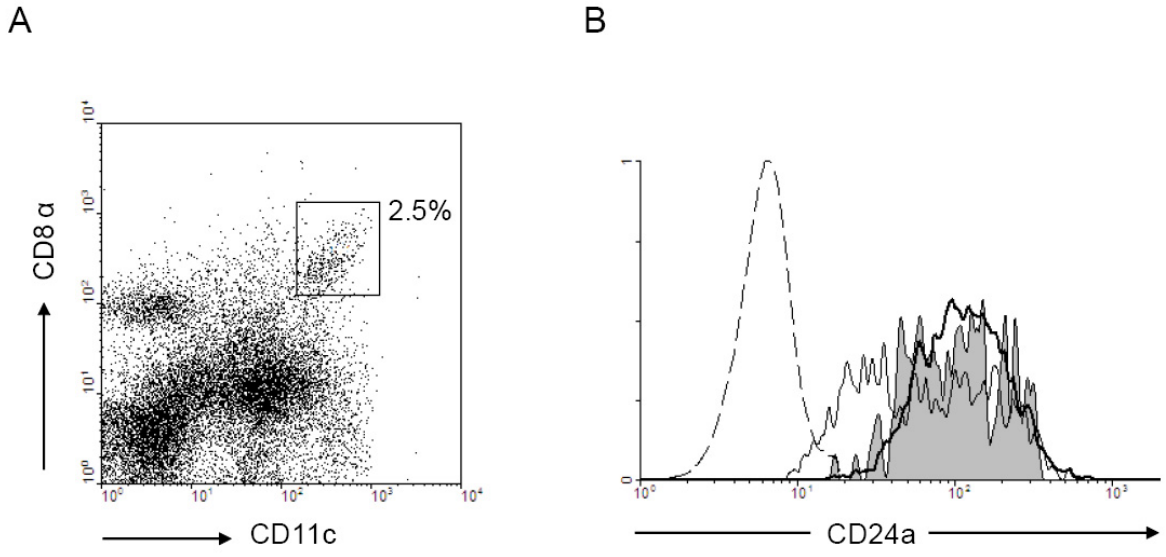


Abbildung 9: CD24a Expression bei blood derived CD8□+ DC

hdLK wurden von unbehandelten Mäusen entnommen. DC wurden mittels einer Dichtegradienten-zentrifugation (Optiprep) angereichert und mit anti-CD11c, -CD8□, -Langerin und -CD24a gefärbt. In (A) wird das Färbemuster von CD8□ und CD11c nach der DC Anreicherung gezeigt. Die Frequenz der CD8□+ CD11c+

Zellen ist eingezeichnet. Der Graph in (B) zeigt die Expression von CD24a der CD11c+ CD8□+ Langerin- (dünne schwarze Linie) und der CD11c+ CD8□+ Langerin+ Zellen (grau schattierter Graph). Als Positivkontrolle dienen CD11c+ Langerin+ (dicke schwarze Linie), als Negativkontrolle die Isotypkontrolle (gepunktete Linie).

3.1.7 LZ und dDC exprimieren hohe Level an CD40

In der von Ruedl et al. beschriebenen Methode wurden LZ und dDC nach einer Anreicherung im Dichtegradienten mit Hilfe einer Färbung von CD11c und CD40 unterschieden [Ruedl et al., 2000]. Zum damaligen Zeitpunkt war ein Langerinantikörper nicht verfügbar und es galt nun diese Methode mit der Färbung für Langerin und CD24a zu korrelieren. Das Protokoll sieht hier eine Anreicherung der LK Zellen vor. Dies bedeutet immer ein Verlust an Zellen. Durch die Überprüfung und Bestätigung dieser Methode könnte in Zukunft auf die Anreicherung verzichtet werden. Zunächst wurde eine aktive Migration der Haut-DC zum LK durch die Applikation von FITC auf die rasierte ventrale Haut induziert. Die drainierenden LK wurden dann nach 2 und 4 Tagen mit AK gegen CD11c, CD40, Langerin und CD24a gefärbt. Abbildung 10A zeigt, dass die Population *A* CD40-hoch CD11c-mittel und Population *B* CD40-hoch CD11c-hoch exprimierende DC beinhaltet. Es konnten eindeutige Unterschiede in der Frequenz der LZ in den beiden Populationen nach zwei und vier Tagen gefunden werden. In beiden waren Langerin exprimierende Zellen zu finden, wobei der größte Anteil mit ca. 70% bei den CD40-hoch CD11c-hoch exprimierenden Zellen (Population B) lag. Da aber auch Langerin+ sowie CD24a-hoch exprimierende Zellen in Population *A* zu finden waren, kann man schlussfolgern, dass für die Unterscheidung von LZ und dDC Langerin oder CD24a gut geeignet ist, das Expressionslevel von CD11c auf der Oberfläche scheint sich dagegen nicht anzubieten.

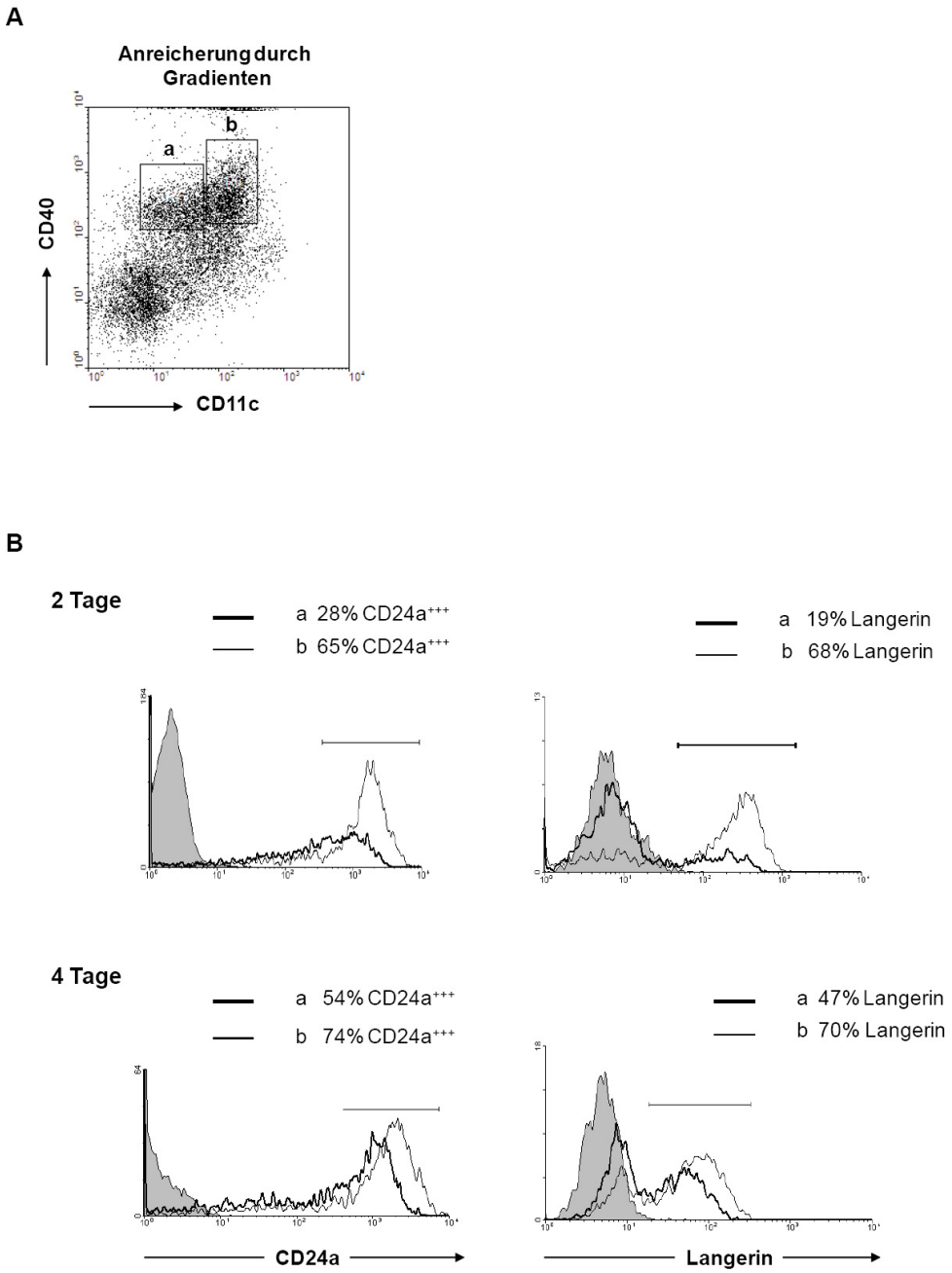


Abbildung 10: Vergleich der CD40/CD11c Expression mit der Langerin/CD24a Färbung

Die ventrale Haut von C57BL/6 Mäusen wurde mit FITC bepinselt, um eine aktive Wanderung der DC aus der Haut zum drainierenden LK zu induzieren. Nach 48h und 96h wurden die LK entnommen und mit einem Dichtegradienten die DC angereichert. Es folgte die Färbung mit CD40, DC11c, CD24a und Langerin. (A) Der repräsentative Dot Plot vom 48h Zeitpunkt zeigt die CD11c+ CD40-hoch exprimierenden Zellen (Population a) und die CD11c-hoch CD40-hoch exprimierenden Zellen (Population b). Diese Zellen wurden weiter auf die Expression von Langerin und CD24a untersucht. Der prozentuale Anteil der CD24a-hoch exprimierenden und der Langerin+ Zellen wurde für a (dicke schwarze Linie) und b (dünne schwarze Linie) berechnet. Der grau schattierte Graph stellt die Isotypkontrolle dar.

3.2 Das Chemokin CCL17 ist in der Haut induzierbar

Das Chemokin CCL17 wird konstitutiv in der Lunge und im Darm exprimiert [Alferink et al., 2003]. Die normale unbehandelte Haut hingegen weist keine CCL17+ auf Zellen. Es stellte sich zunächst die Frage, ob diese Expression induzierbar ist. Da CCL17 in Mäusen ausschließlich von DC sezerniert wird, und CCL17 eng mit allergischen Immunreaktionen assoziiert ist [Romagnani, 2002], wurde untersucht, ob sich die CCL17 Expression durch epikutane Applikation eines Haptens induzieren lässt.

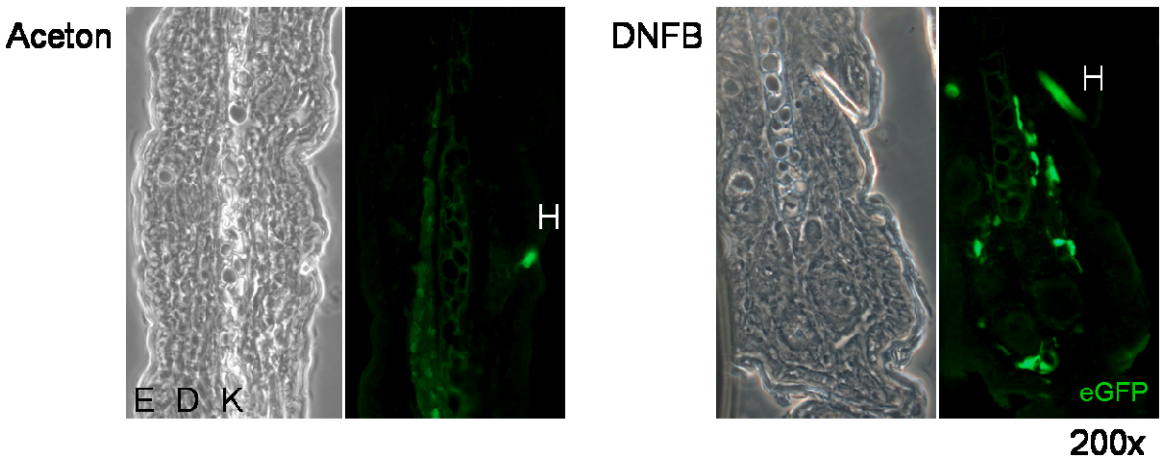


Abbildung 11**: Die Expression von CCL17 ist durch die Applikation eines Haptens induzierbar.**
Ohren von CCL17E/+ Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) wurden auf der ventralen und dorsalen Seite mit Aceton/Olivenöl (linken zwei Bilder) oder mit 0.5% DNFB in Aceton/Olivenöl (rechten zwei Bilder) für 3h behandelt. Gezeigt sind jeweils das Durchlichtbild und die Aufnahme im Grünkanal des Mikroskops. Zu beachten ist die Autofluoreszenz der Haare (H), sowie der Knorpelzellen (K) in der Mitte der Ohren. An den äußeren Rändern befinden sich jeweils die Epidermis (E) und die Dermis (D).

CCL17E/+ Mäusen, welche sowohl funktionelles CCL17 als auch eGFP exprimieren, wurden als Reportermäuse verwendet und auf der ventralen und dorsalen Seite mit DNFB oder nur dem Lösungsmittel Aceton/ Olivenöl bepinselt. Nach drei Stunden wurden die Ohren abgenommen und auf das Vorhandensein von grünen Zellen histologisch untersucht. In Abbildung 11 wird deutlich, dass die Stimulierung mit DNFB zu einer Expression von eGFP und damit auch zu einer Expression von CCL17 führte. Mikroskopische Analysen zeigten, dass besonders innerhalb der Dermis grüne, mit langen Dendriten behaftete Zellen zu finden

sind. Die Epidermis sah negativ für CCL17 aus. Ohren die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden, wiesen keine eGFP und damit auch keine CCL17 Expression auf. Es wurde deutlich, dass die Expression von CCL17 in der Haut erst induziert werden muss und konstitutiv nicht anzutreffen ist. Zudem wird CCL17 im Modell der CHS durch DNFB in der Haut induziert.

3.3 CCL17 in Atopischer Dermatitis

3.3.1 AD Behandlung induziert die Expression von CCL17 in der Haut

CCL17 wird während allergischen Reaktionen stark herauf reguliert und ist besonders bei Patienten mit atopischen Krankheiten, wie Asthma und AD nachgewiesen worden. Normale gesunde Haut ist negativ für das Chemokin CCL17, jedoch kann wie in Abb. 10 gezeigt, die CCL17-Expression mit einem Hapten induziert werden. Um die Rolle von CCL17 bei der Pathogenese der AD näher zu untersuchen, wurde ein AD Mausmodell im Labor etabliert. Es gibt verschiedene Mausmodelle, um die Symptome einer AD zu studieren [Jin et al., 2009]. Eine bewährte Methode Symptome in gesunden Wildtyp Mäusen hervorzurufen, wurde von Spergel et al. [Spergel et al., 1998] beschrieben. In Abb. 3 ist ein Schema für die Durchführung des Protokolls gezeigt. In drei Behandlungsintervallen in einem Zeitraum von 7 Wochen wurden die Tiere während einer Inhalationsnarkose epikutan mit einem Pflaster enthaart und mechanisch gereizt. Es folgte die Applikation des Antigens Ovalbumin (OVA) auf die irritierte Haut mit einem Mullstück welches mit einem Pflaster fixiert wurde. Als negative Kontrolle dienten Mäuse, die statt OVA nur das Lösungsmittel Natriumchlorid erhielten. Die wiederholte Sensibilisierung gegen das Modellallergen führte zur Manifestation der Symptome der AD (eigene Untersuchung und [Spergel, 2008]). Für das AD Mausmodell wurden heterozygote Mäuse (CCL17E/+), die CCL17 und eGFP exprimieren, sowie eGFP homozygot-exprimierende CCL17-defiziente Mäuse (CCL17E/E) verwendet. Beide Mauslinien wurden nach der Methode von Spergel et al. [Spergel et al., 1998] behandelt. Die CCL17E/+ Mäuse zeigen normale Immunantworten und wurden während der gesamten Studie wie Wildtypen verwendet. Dies ermöglichte, einen funktionellen Einfluss der eGFP-Expression auf die Ergebnisse auszuschließen, da eGFP gleichermaßen in DC

beiden Mauslinien ausgeprägt wird. Die erste Frage, die sich stellte, war, ob sich durch mechanische Reizung und die chronische Behandlung mit dem Modellallergen OVA eine CCL17-Expression in der Haut induzieren lässt. Dafür wurde nach der AD-Behandlung, die behandelte Haut histologisch auf grüne Zellen untersucht. In der mechanisch gereizten und NaCl-behandelten Haut waren vereinzelt eGFP exprimierende Zellen zu sehen, die OVA-Behandlung führte aber zu einem deutlich höheren Anteil an diesen Zellen in der Haut. Der größte Teil der eGFP+ Zellen konnte in der Dermis ausgemacht werden (Abb. 12). Innerhalb der Epidermis waren nur vereinzelt grüne Zellen zu detektieren.

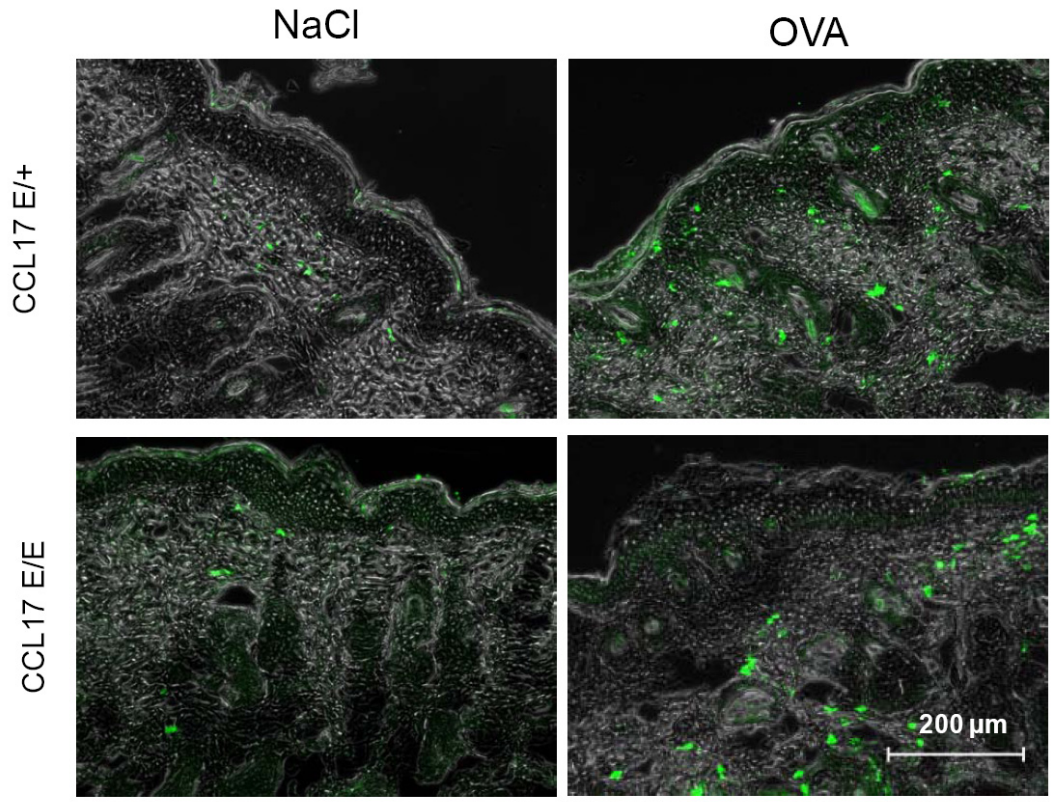


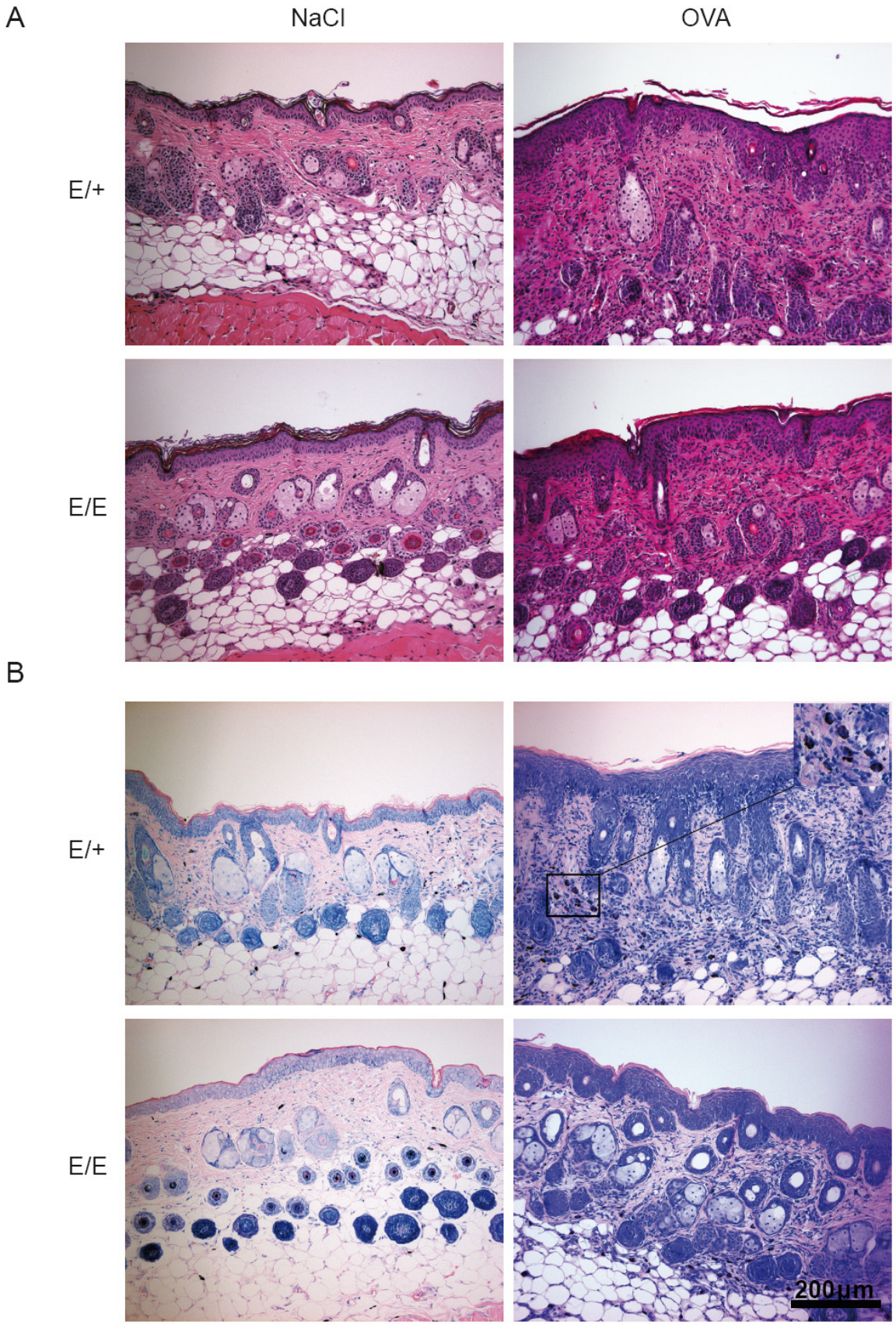
Abbildung 12: Heraufregulierung von CCL17 im AD Mausmodell.

CCL17E/+ und CCL17E/E Mäuse erhielten 3 Behandlungen mit dem schnellen Abziehen eines Pflasters auf der rasierten Rückenhaut. Es folgte die Applikation von 1% OVA in NaCl (OVA) oder nur dem Lösungsmittel (NaCl). PFA fixierte Hautschnitte wurden mit α-GFP ALEXA 488 gefärbt. Die grüne Fluoreszenz wurde mit dem Durchlichtbild überlagert, um die Struktur der Haut sichtbar zu machen.

3.3.2 Normale Entwicklung von Akanthose, aber reduzierte dermale Entzündung in CCL17-defizienten Mäusen

Die mechanische Reizung, die durch das schnelle Pflasterabziehen verursacht wurde, und die nachfolgende Applikation von NaCl führte sowohl bei CCL17E/+ als auch bei CCL17E/E Mäusen nur zu einer geringen Dickenzunahme der Epidermis. Wurde das Antigen OVA aufgetragen, so nahm die Dicke der Epidermis bei den CCL17E/+ und den CCL17E/E Mäusen gleichermaßen zu. In der Medizin versteht man unter einer Verdickung der Epidermis, vermittelt durch eine erhöhte Anzahl an Keratinozyten eine Akanthose. Verursacht wurde diese durch eine gesteigerte Proliferation von Keratinozyten, die sich dann in zusätzlichen Schichten innerhalb der Epidermis anlagern (Abbildung 13A). Die gleiche Stärke der Akanthose bei beiden Mauslinien zeigt, dass CCL17 keinen Einfluss auf die Proliferation der Keratinozyten im AD-Mausmodel hat. Anders verhielt es sich bei der Dermis. Hier ist die Dicke der Dermis ein Maß für die Stärke der Entzündung, welche durch einwandernde Leukozyten und durch eine erhöhte Kollagenproduktion gekennzeichnet ist [Spergel, 2008]. Abbildung 12A zeigt, dass nach der OVA Behandlung die Dickenzunahme der Dermis von CCL17E/E Mäusen, im Vergleich zu den OVA-behandelten CCL17E/+ Mäusen, deutlich reduziert war. Dies bedeutet, dass die Abwesenheit von CCL17 zu einer geringeren Entzündung führt. Die Applikation von NaCl hatte in beiden Mauslinien kaum einen Einfluss auf die Dicke der Dermis.

Da die Einwanderung von Mastzellen und eosinophile Granulozyten typisch für allergische Hautreaktionen ist, wurde deren Vorkommen histologisch untersucht. Die Färbung von Paraffinschnitten mit Giemsa ermöglichte die Darstellung von Mastzellen als dunkelblaue Zellen (siehe Vergrößerung in Abbildung 13B). Die Behandlung mit OVA führte zu einem fast dreifachen Anstieg an Mastzellen in der Haut, wenn CCL17 anwesend ist (Abb. 13B und E). Ist CCL17 nicht anwesend, so ist die Infiltration von Mastzellen nach der OVA-Behandlung um ein Drittel reduziert im Vergleich zu OVA-behandelten CCL17E/+ Mäusen. Die Lösungsmittelkontrolle zeigte, dass ohne Antigen die Zahl der Mastzellen in beiden Mauslinien vergleichbar ist (Abb. 13E).


A
NaCl
OVA
E/+
E/E
B
E/+
E/E
200µm

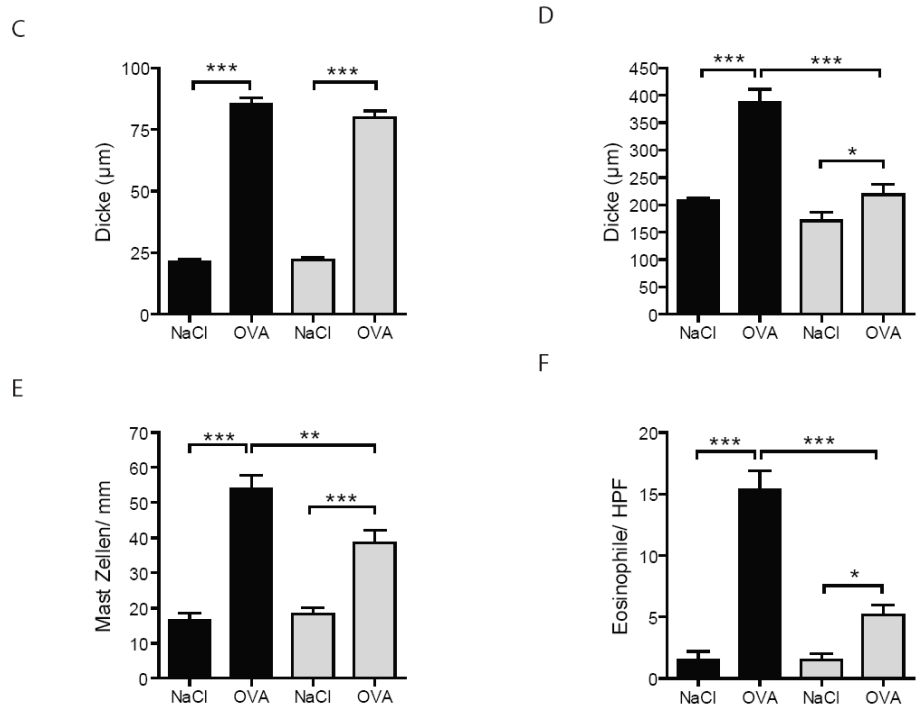


Abbildung 13: Entstehung einer Akanthose und einer dermalen Entzündung im AD Modell.

Mäuse wurden in 3 Behandlungsintervallen mit Pflasterabziehen und einer Applikation von 1% OVA in NaCl (OVA) oder nur dem Lösungsmittel (NaCl) behandelt. 24h nach der letzten Behandlung wurde die Haut in 4% PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte von CCL17E/+ (E/+) und CCL17E/E (E/E) wurden mit H&E (A) und Giemsa (B) angefärbt. Der Ausschnitt in (B) zeigt in einer Vergrößerung, wie sich Mastzellen mit ihren dunklen gefärbten Vesikeln im Gewebe darstellten. Die Dicke der Epidermis (C) und Dermis (D) wurde an 6 zufällig gewählten Bereichen pro Schnitt gemessen und die Mittelwerte für insgesamt zwölf Mäuse aus zwei unabhängigen Experimenten (mit 6 Mäusen pro Gruppe) berechnet. Mastzellen (E) wurden in den Schnitten gezählt, die mit Giemsa (B) gefärbt waren. Eosinophile wurden mit H&E dargestellt und pro Durchlichtbild bei 400x Vergrößerung gezählt (F) (n=6 Mäuse, zwei unabhängige Experimente). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM.

Während einer Immunreaktion werden im LK naïve T-Zellen aktiviert und klonal expandiert. Die entstandenen Effektor-T-Zellen wandern aus dem LK in die Peripherie zum Ort der Entzündung. Diese Wanderung wird durch Chemokine gesteuert. Aktivierte T-Zellen, sowie Gedächtnis- und regulatorische T-Zellen exprimieren CCR4 und können einem Gradienten von CCL17 folgen und so an den Ort der CCL17-Sezernierung in der OVA-behandelten Haut finden. Es wurde daher der Einfluss von CCL17 auf die Präsenz von CD4+ Zellen in der Haut untersucht. Deren Anzahl wurde in NaCl- und OVA-behandelter Haut von CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen histologisch dargestellt und quantifiziert (Abb. 14). In Bezug auf die Lösungsmittelkontrollen konnte in beiden Mauslinien eine Erhöhung der T-Zellanzahl

festgestellt werden. Allerdings war die Infiltration an CD4+ T-Zellen in den OVA-behandelten CCL17E/E Mäusen im Vergleich zu den OVA-behandelten CCL17E/+ Mäusen signifikant reduziert (Abb.14A und B).

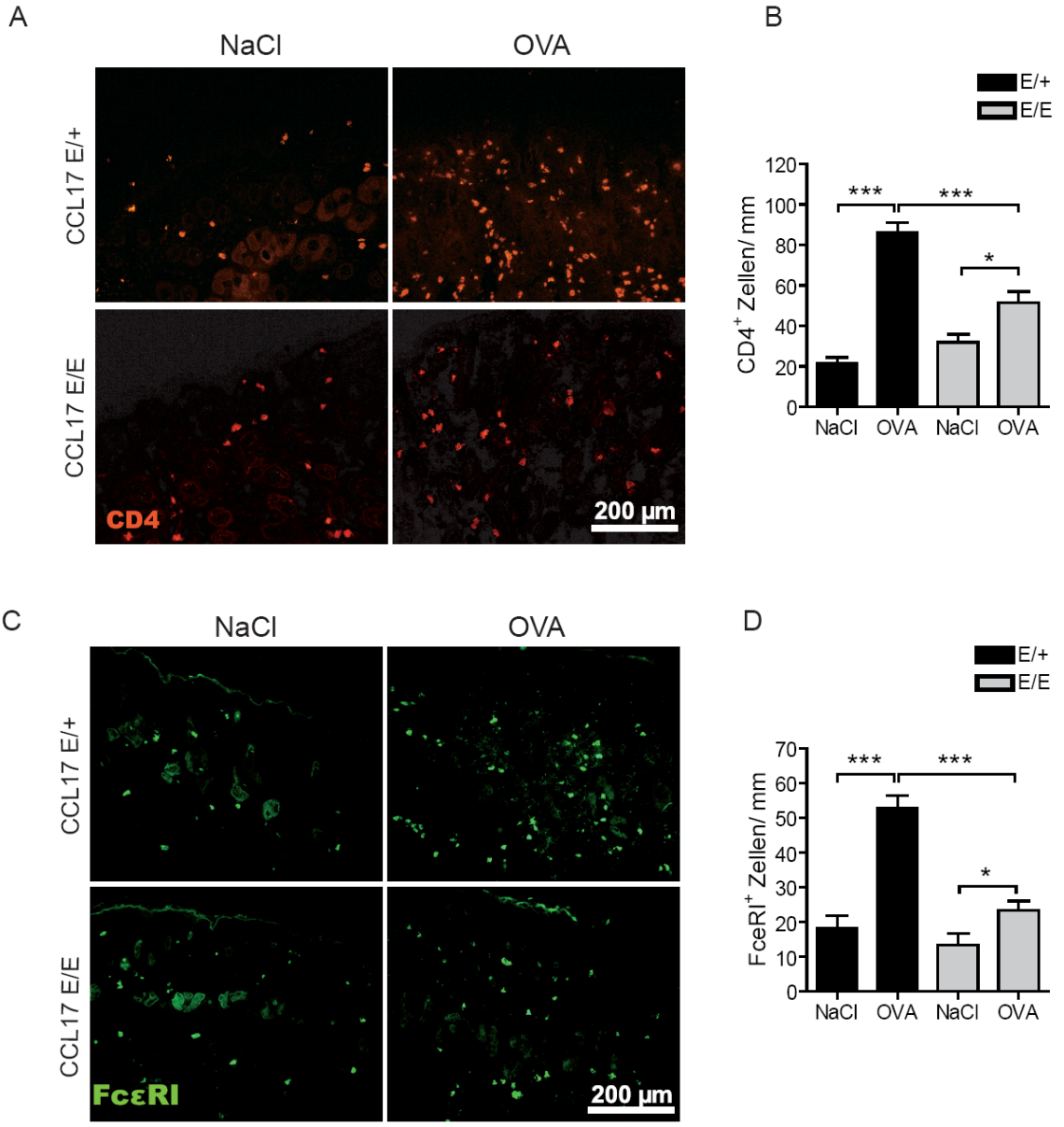


Abbildung 14: Quantifizierung der CD4+ T Zellen und der FcεRI+ Zellen in der behandelten Haut.

Gefrierschnitte von CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen wurden nach der Durchführung des AD Modells mit anti-CD4 (A) oder anti-FcεRI (C) gefärbt. Die absolute Zellzahl der eingewanderten CD4+ T-Zellen (B) und der FcεRI+ Zellen (D) wurde in 6-8 unabhängigen Bereichen eines Schnittes gezählt. Der Mittelwert mit der ± SEM wurde pro ein Millimeter Epidermis, welche die entsprechende Fläche an Dermis überspannte, berechnet. Die Daten sind repräsentativ für drei Experimente mit jeweils 5-7 Mäuse pro Gruppe.

Auch die FcεRI Expression wurde histologisch analysiert. FcεRI ist der hoch affine Rezeptor für IgE, der vornehmlich von Mastzellen exprimiert wird, aber auch bei Basophilen, Makrophagen und DC zu finden ist. Liegt ein hoher Titer an IgE im Serum vor, so wird die FcεRI Expression herauf reguliert. Binden die IgEs in großer Zahl an FcεRI Rezeptoren, so werden diese nach der Bindung des spezifischen Allergens an das IgE quervernetzt. Es kommt zu einer Ausschüttung von Histamin und TNF□. Die FcεRI Expression gilt daher auch als Indiz für eine allergische Reaktion. In Abwesenheit von CCL17 ist aufgrund der reduzierten Heraufregulierung von FcεRI die allergische Reaktion deutlich reduziert. Im AD Modell zeigte sich, dass die Anzahl von FcεRI exprimierenden Zellen in den OVA-behandelten Mäusen signifikant geringer ist, wenn CCL17 nicht anwesend ist (Abb.14 C und D).
Zusammenfassend kann man sagen, dass in Abwesenheit von CCL17 die dermale Infiltration mit CD4+ T-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen stark reduziert ist.

3.3.3 Durch CCL17 wird die allergen-spezifische humorale Immunantwort verstärkt

Erhöhte Serumtiter von allergen—spezifischem IgE sind charakteristische Kennzeichen der extrinsischen Form der AD, von der 70-80% der AD Patienten betroffen sind [Homey et al., 2006]. Die Anwendung des AD Mausmodells führte zu einem 5fachen Anstieg des gesamten IgE-Spiegels in OVA-behandelten CCL17E/+ Mäusen im Vergleich zu den NaCl-behandelten CCL17E/+ Mäusen (Abb. 15). Im Gegensatz dazu war der Gesamt-IgE-Spiegel in den OVA behandelten CCL17E/E Mäusen 50% niedriger im Vergleich zu den OVA-behandelten heterozygoten Kontrollen. Dennoch war der IgE-Spiegel in den CCL17-defizienten Mäusen deutlich höher nach OVA-Behandlung im Vergleich zu NaCl-behandelten CCL17E/E Mäusen. Ebenso konnte eine deutliche Reduzierung des OVA-spezifischen (Antigen-spezifischen) IgE-Titers in den CCL17-defizienten Mäusen im Vergleich zu den CCL17E/+ Mäusen gezeigt werden. Weitere Kennzeichen der AD sind antigen-spezifische Immunglobuline wie IgG1 und IgG2a, die deshalb näher untersucht wurden. Deren Antikörpertiter waren nach OVA Behandlung und in Abwesenheit von CCL17 fast um die Hälfte niedriger im Vergleich zu den OVA behandelten heterozygoten Tieren (Abb. 15). Man kann daraus schlussfolgern, dass

CCL17 eine wichtige Rolle bei der Induzierung der allergen-spezifischen humoralen Immunantwort im AD Mausmodell spielt.

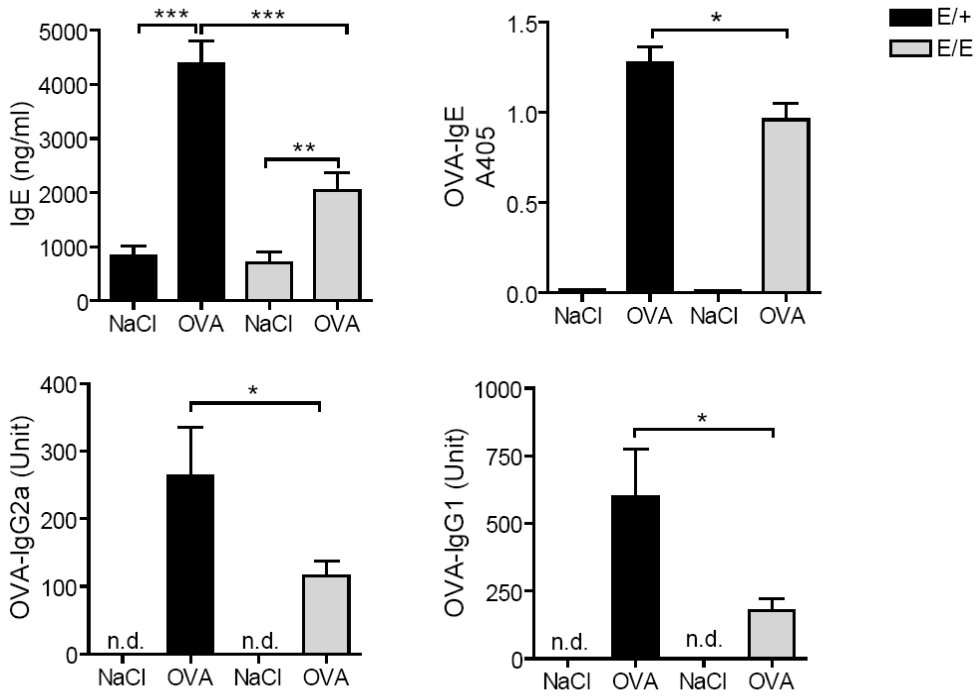


Abbildung 15: Die antigen-spezifische humorale Immunantwort ist in Abwesenheit von CCL17 reduziert.

CCL17E/+ (E/+) und CCL17E/E (E/E) Mäuse wurden in drei Behandlungsintervallen mit Pflasterabziehen und Applikation eines 1% OVA (OVA) oder Lösungsmittel (NaCl) getränktem Pflaster behandelt. 24h nach der letzten Behandlung wurde den Mäusen das Blut entnommen und das Serum gewonnen. Mit einem Standard ELISA Protokoll wurde die Gesamt-Menge an IgE gemessen (oben links). OVA-spezifisches IgE wurde indirekt durch OVA markiertes Biotin detektiert. Die Mittelwerte der ODs aus zwei Experimenten mit 5-7 Mäusen pro Gruppe wurden mit ± SEM dargestellt. OVA-spezifisches IgG1 und –IgG2a wurde mit OVA-gebundenen ELISA Platten gemessen. Die Titer wurden als Units im Vergleich zu einem Standardreferenz Serum berechnet. Drei unabhängige Experimente mit 5-7 Mäusen wurden zusammengefügt und die Mittelwerte ± SEM sind gezeigt.

3.3.4 CCL17 verstärkt die Th1- und Th2-Zytokinproduktion in der läsionalen Haut

Die Hautläsionen von AD Patienten sind von einer hohen Expression an Zytokinen gekennzeichnet. Um einen besseren Überblick über die Expression der Zytokine in der läsionalen Haut im AD Mausmodell zu bekommen und den Einfluss von CCL17 auf die Zytokinproduktion zu analysieren, wurde die Haut nach der letzten Behandlung bei -80°C eingefroren, um später die RNA zu isolieren. Nach dem Umschreiben in cDNA wurde die Expression diverser Zytokine mittels RT-PCR relativ quantifiziert (Abb. 16). Im Gegensatz zu den OVA-behandelten CCL17E/+ Mäusen, waren Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-13 und IL-10 in den OVA-behandelten CCL17-defizienten Mäusen, sowie in den NaCl-behandelten Mäusen signifikant reduziert und kaum detektierbar. Auch das Th1-Zytokin IFN-γ war signifikant in der Expression vermindert, wenn CCL17 während der OVA-Behandlung abwesend war. In den CCL17E/+ Mäusen führte die OVA Behandlung zu einem großen Anstieg der IL-1β Expression im Vergleich zur Lösungsmittel Kontrolle. In CCL17-defizienten Mäusen gab es kaum Unterschiede in der IL-1ß Expression zwischen OVA- und NaCl-behandelten Mäusen. Weiterhin wurde die RNA von FoxP3 analysiert, um Hinweise über die Menge an rekrutierten regulatorischen T-Zellen zu erhalten. Es konnte eine signifikant geringere Menge an FoxP3 in den OVA-behandelten CCL17E/E Mäusen im Vergleich zu den OVA-behandelten CCL17E/+ Tieren festgestellt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Abwesenheit von CCL17 zu einer stark verminderten Expression von Th1- und Th2-Zytokinen in der läsionalen Haut im Vergleich zu WT Mäusen führt.

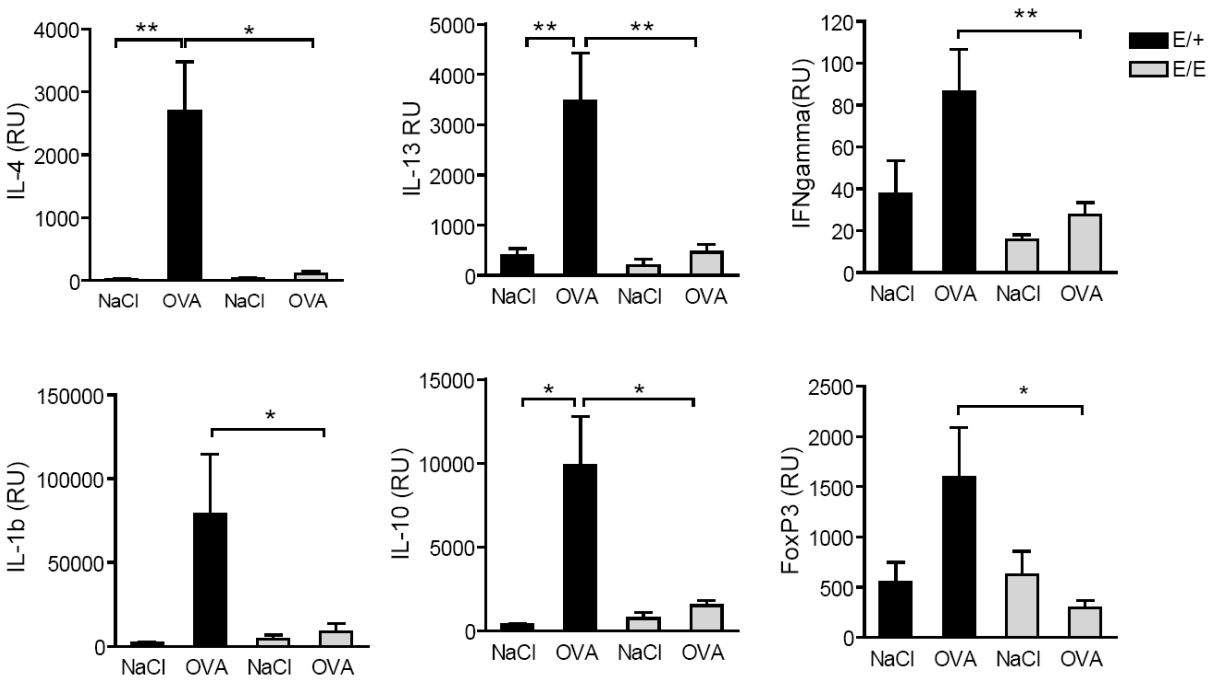


Abbildung 16: mRNA Expression von Zytokinen in der behandelten Haut

24h nach der letzten Behandlung im AD Modell wurden Hautproben der behandelten Haut bei -80% eingefroren und die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Real time PCR wurde mit Primern und Proben (Applied Biosystems) für IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN-γ, IL-1β und FoxP3 durchgeführt. Es wurden Proben von 5-8 Mäusen pro Gruppe analysiert und die Mittelwerte ± SEM aufgetragen. Diese Daten wurden in Kooperation mit H. Alenius von T. Savinko aus Helsinki angefertigt.

3.3.5 Die Abwesenheit von CCL17 führt zur verminderten Effekto- T-Zellbildung im hdLK

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Zytokinexpression in der OVA behandelten Haut von CCL17-defizienten Mäusen könnte die reduzierte Infiltration von CD4+ T- Zellen in die Haut sein. Um ein vollständiges Bild über die T-Zellaktivierung in den CCL17-defizienten Mäusen nach der AD-Behandlung zu erhalten, wurde die Frequenz der T-Zellen und deren Zytokinexpression in den hdLK untersucht. Die absolute Zellzahl der LK war in den CCL17E/+

Mäusen mit OVA um das 3fache erhöht, während die CCL17-defizienten Tiere nur eine Verdoppelung der Zellzahl im Vergleich zur NaCl-Kontrolle aufwiesen (Abb. 17A). Der prozentuale Anteil an CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+) sank nach der OVA Behandlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ab (Abb. 17B). Ist CCL17 nicht anwesend, so war diese Reduktion nicht so stark ausgeprägt (Abb. 17B). Der Anteil an IL-4 und IL-5 produzierenden T-Zellen im LK war durch OVA in den CCL17E/+ Mäusen signifikant erhöht (Abb. 17C und E). In den CCL17-defizienten Mäusen konnte nach der chronischen OVA-Behandlung keine signifikante Steigerung der Frequenz der IL-4- und IL-5-produzierenden T-Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gemessen werden (Abb. 17C und E). Auch die Anzahl der IL-4 und IL-5-poduzierenden T-Zellen stieg nach OVA in CCL17E/+ Tieren an (Abb. 17D und F). In Abwesenheit von CCL17 (CCL17E/E Mäuse) war diese Anzahl deutlich reduziert (Abb. 17D und F). Außerdem führte die Behandlung mit OVA zu einer erhöhten Frequenz (Abb. 17G), sowie zu einer erhöhten Zellzahl an IFNγ- produzierenden T-Zellen im LK (Abb. 17H) von den CCL17E/+ Tieren. Die Defizienz von CCL17 wirkte sich nur moderat reduzierend aus (Abb. 17G und H). Die absoluten Zahlen der FoxP3+ regulatorischen T-Zellen (Abb. 17K) waren in den CCL17E/E Mäusen reduziert, nicht aber die Frequenzen von FoxP3+ Zellen. Ähnliches fand man bei den IL-17 sezernierenden Zellen. Auch hier waren die Frequenzen der IL-17+ T-Zellen von der Abwesenheit von CCL17 nicht beeinflusst (Abb. 17I). Jedoch war die absolute Zellzahl in den CCL17E/E Mäusen im Vergleich zu den CCL17E/+ Mäusen reduziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Entstehung von Effektor T-Zellen in Abwesenheit von CCL17 reduziert ist.

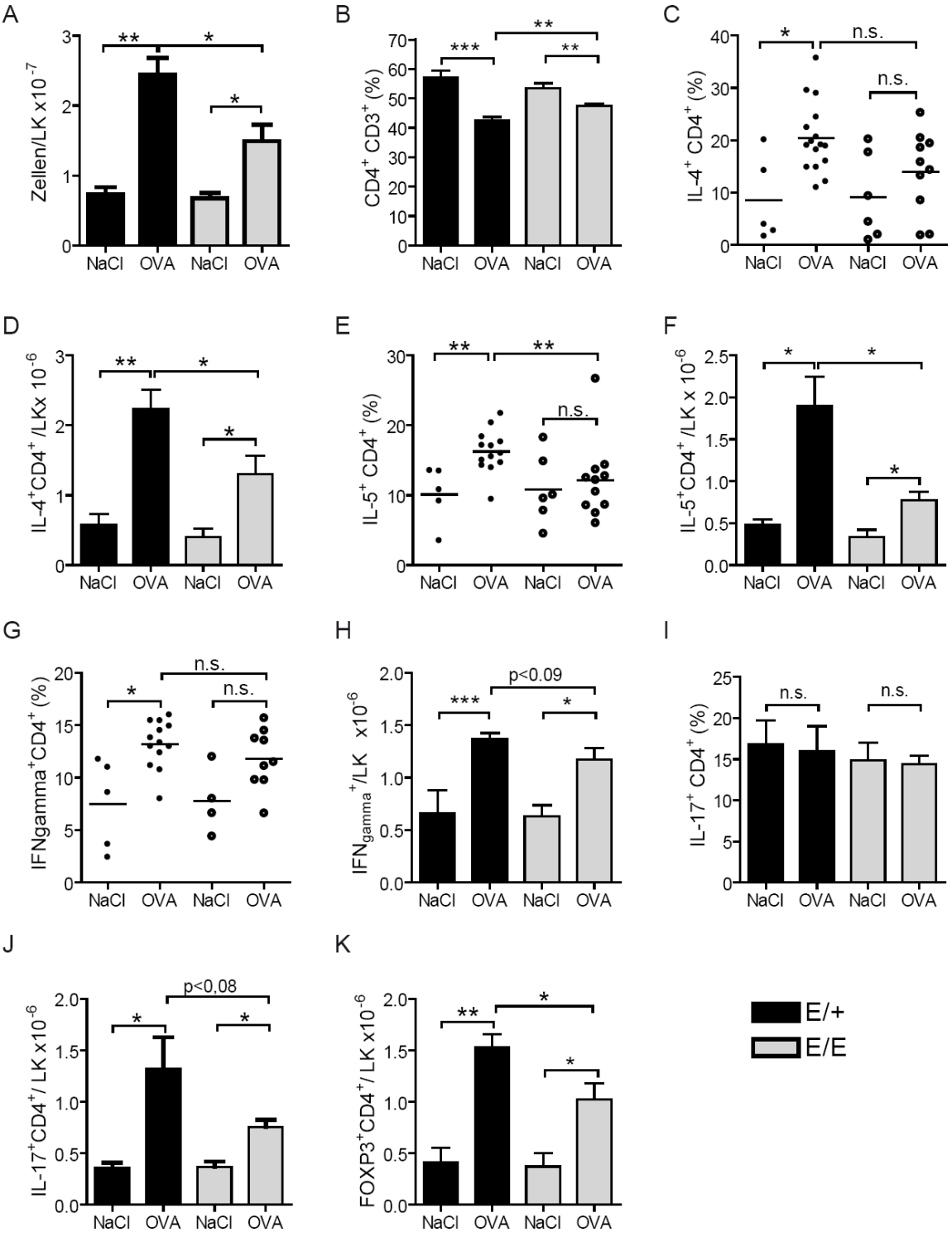


Abbildung 17: Quantifizierung der Effektor-T-Zellen im hdLK

CCL17E/+ (E/+) und CCL17E/E (E/E) Mäuse wurden in drei Behandlungsintervallen mit Pflasterabziehen und 1% OVA in NaCl (OVA) oder nur dem Lösungsmittel (NaCl) behandelt. 24h nach der letzten Behandlung wurden die Zellen der brachialen LK gezählt (A). Der Anteil der T-Zellen (B) und die Anzahl der regulatorischen T-Zellen wurde mit der Färbung gegen FoxP3 bestimmt (K). Die Zytokinproduktion wurde *in vitro* restimuliert, indem die

LK Zellen für 2h mit PMA und Ionomycin und *Golgi Stop®* inkubiert wurden. Die Expression von IL-4 (C), IL-5 (E), IFN-γ (G) und IL-17 (I) in den CD3+CD4+ Zellen wurde mit einer intrazellulären FACS Färbung gemessen und die absoluten Zahlen von Effektor-T-Zellen berechnet (D, F, J). In (C, E, G) sind die individuellen Datenpunkte gezeigt (CCL17E/+ Mäuse als Punkte und die CCL17E/E Mäuse als Ringe) wobei der Mittelwert als Balken dargestellt ist. Bei den LK der NaCl-behandelten Mäuse wurden jeweils drei Mäuse für jede Messung zusammengefügt, während die LK der OVA-behandelten Mäuse einzeln betrachtet wurden. Die Daten wurden von drei individuellen Experimenten vereint. Es wurde der *Sudent's t*-Test angewendet. Nur bei (C, E, G) wurde der *Mann-Whitney U Test* benutzt

3.3.6 Gestörte Wanderung der DC in den hdLK und der läsionalen Haut in CCL17-defizienten Mäusen

Die absolute Zellzahl von DC (CD11c+ Zellen) in den drainierenden LK steht im engen Zusammenhang mit der Vergrößerung der LK nach der OVA-Behandlung. In der Annahme, dass die eingewanderten LZ und dDC im hdLK weitere Lymphozyten rekrutieren und dies zu der Vergrößerung des LK führt, wurde untersucht, wie die DC im AD Mausmodell in den LK eingewandert waren. In den WT ähnlichen Tieren stieg die DC Zahl auf das 4-5fache an, während CCL17-defiziente Mäuse nur einen zweifachen Anstieg an DC aufwiesen (Abb. 18A). Obwohl die Frequenz der DC nach OVA im Vergleich zur NaCl Kontrolle anstieg, konnte dabei kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden (Abb. 18B). Die DC Population im hdLK setzt sich aus mehren DC Subtypen zusammen, die alle durch unterschiedliche Eigenschaften und Merkmale gekennzeichnet sind. Um die Anzahl der aus der Haut kommenden DC im LK zu quantifizieren, wurden die LZ und dDC basierend auf deren hohe Expression an MHC Klasse II (MHCII) und der differentiellen Expression an CD24a identifiziert (siehe Abschnitt 3.1). Es konnte nach der OVA-Behandlung eine deutliche Immigration von LZ und dDC im Vergleich zur NaCl Kontrolle bei beiden Mauslinien festgestellt werden. Dennoch wiesen die CCL17E/E Mäuse nach der OVA-Behandlung eine deutlich reduzierte Einwanderung an DC (Abb. 18A), LZ (Abb. 18C) und dDC (Abb. 18E) im Vergleich zu den CCL17E/+ Mäusen auf. Zu bemerken sei, dass sich der prozentuale Anteil an DC nicht änderte (Abb. 18B).

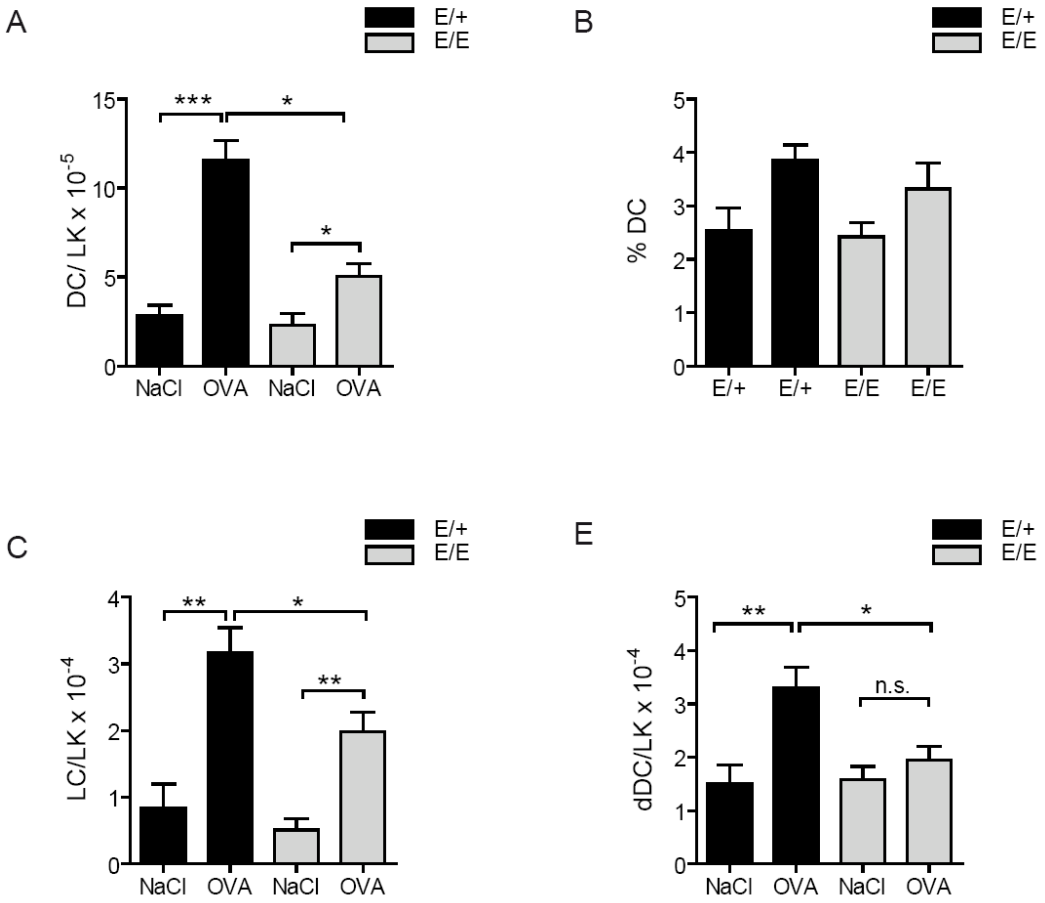
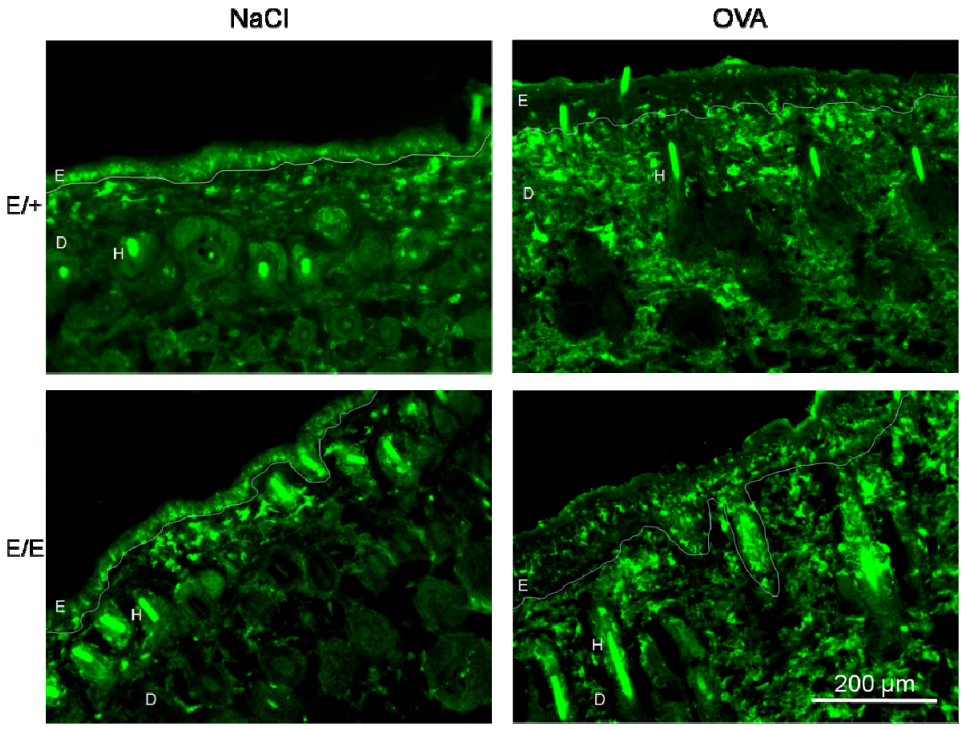


Abbildung 18: Anzahl der DC in den Haut-drainierenden LK (hdLK).

Die absolute Zellzahl der CD11c+ DC (A), der Anteil an CD11c+ DC (B) und die Anzahl der LZ (C) und dDC (D) pro brachialen LK wurden durch eine FACS Färbung für CD11c, MHCII und CD24a ermittelt. Im Fall der NaCl-Kontrollen wurden die LK von jeweils drei Mäusen vereint, die LK der OVA-behandelten Mäuse wurden hingegen alle einzeln analysiert. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5-7 Mäusen pro Gruppe wurden zusammengefügt.

Die Einwanderung von DC der Haut in den drainierenden LK war in Abwesenheit von CCL17 reduziert. Es stellte sich daher die Frage, ob die Auswanderung aus der Haut ebenfalls beeinträchtigt war. Dafür wurden von der behandelten Haut der Mäuse aus dem AD Mausmodell Gefrierschnitte angefertigt und mit Anti-CD11c gefärbt, um die DC darzustellen. Der mechanische Stress und die Gabe von NaCl induzierten keine erkennbare Auswanderung der LZ in den CCL17E/+ und den CCL17E/E Mäusen (Abb. 19A). Die LZ waren geordnet nebeneinander aufgereiht.

A



B

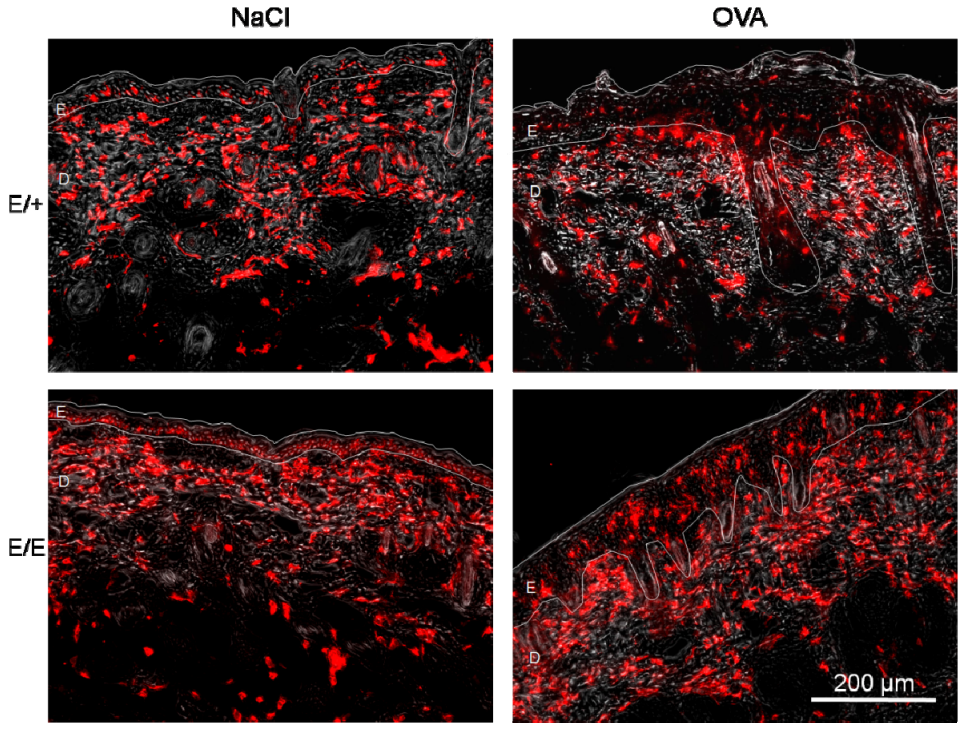


Abbildung 19: Verminderte Auswanderung von DC aus der läsionalen Haut in Abwesenheit von CCL17

CCL17E/+ (E/+) und CCL17E/E (E/E) Mäuse wurden durch Pflasterabziehen und Applikation eines mit 1% OVA oder NaCl getränkten Pflasters für dreimal eine Woche behandelt. 24h nach der letzten Behandlung wurde die behandelte Haut entnommen und mit einer Immunfluoreszenzfärbung analysiert. (A) die Färbung gegen CD11c

zeigt die Lokalisation der DC in der Epidermis „E“ und Dermis „D“. Die Färbung gegen MHCII markiert die LZ in der Epidermis. Hier wurde das Durchlichtbild dem Rotkanal überlagert. Für die bessere Abgrenzung der Epidermis und Dermis wurde nachträglich eine Hilfslinie eingezeichnet. Haarfollikel besitzen eine starke grüne Autofluoreszenz und wurden daher mit „H“ gekennzeichnet. 6-8 unabhängige Bereiche pro Schnitt wurden ausgezählt und die Mittelwerte ± SEM pro Millimeter Epidermis wurden berechnet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils 5-7 Mäusen pro Gruppe.

Wenn die Mäuse allerdings mit OVA-behandelt wurden, so war die Frequenz der LZ in der Epidermis der CCL17E/+ Mäuse um 50% reduziert (Abb. 19A und 20A). Die Zellzahl der CD11c+ Zellen in der Dermis stieg um 100% an (Abb.19A und 20B). Im Gegensatz dazu, war in den CCL17-defizienten Mäusen eine Auswanderung von LZ nach der OVA Behandlung nicht zu beobachten (Abb.19A und 20A). Die LZ verblieben in der Epidermis und durch die Zunahme der Epidermisschichten wurde ihre perlschnurartige Anordnung durchbrochen (Abb. 19A).

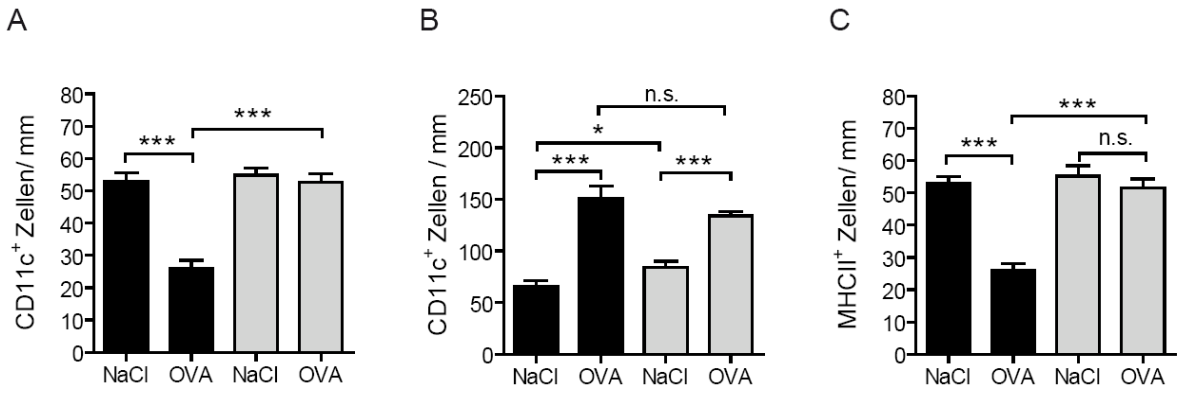


Abbildung 20: Quantitative Auswertung der CD11c und MHCII Färbung der Haut.

6-8 unabhängige Bereiche pro Schnitt (siehe Abb. 19) wurden ausgezählt und die Mittelwerte ± SEM pro Millimeter Epidermis wurden berechnet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils 5-7 Mäusen pro Gruppe.

Um Auszuschließen, dass dieser Effekt durch eine differentielle Expression von CD11c bei den beiden Mauslinien verursacht wird, wurden Gefrierschnitte auch mit MHCII gefärbt, welches in der Epidermis ausschließlich von LZ exprimiert wird. Wie in Abb. 19B und 20C zu

sehen ist, erhielt man die gleichen Ergebnisse für die MHCII+ epidermalen LZ, wie bei der CD11c Färbung (Abb. 20A und C). Die Frequenz der DC in der Dermis war hingegen zwischen den OVA-behandelten CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen gleich stark angestiegen (Abb. 20B). Zusammenfassend kann man daher sagen, dass CCL17 die Auswanderung der DC aus der Haut vermittelt. In Abwesenheit von CCL17 verbleiben die LZ in der Epidermis. Dies wird auch an der reduzierten Einwanderung von dDC und LZ in die hdLK erkennbar.

3.3.7 Die durch ein Hapten induzierte Auswanderung der LZ benötigt CCL17

Die Beobachtung, dass CCL17 die Wanderung von DC beeinflusst, war bisher nicht beschrieben worden. Deshalb sollten die Ergebnisse durch ein weiteres Experiment bestätigt werden. Dafür wurde das Mausmodel der akuten Kontaktsensibilisierung mit DNFB durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Haut-DC in den hdLK in Abwesenheit von CCL17 wandern können. CCL17E/+ und CCL17-defiziente Mäuse wurden auf der dorsalen Seite rasiert und mit DNFB bepinselt. Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel Aceton/Olivenöl. Die maximale Menge an eingewanderten dDC erfolgt nach 1-2 Tagen, Lz benötigen jedoch 3-4 Tage bis sie im drainierenden LK ankommen [Kissenpfennig et al., 2005]. Daher wurde die Anzahl der dDC und LZ nach zwei und vier Tagen in den hdLK untersucht. In CCL17E/E Mäusen war nach der DNFB Behandlung nach 4 Tagen die Anzahl der LZ deutlich geringer im Vergleich zu den CCL17E/+ Tieren (Abb. 21). Bei den dDC konnte dieser Unterschied schon zwei Tage nach der DNFB Behandlung beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor gemachten Befunde, dass die Immunantworten der CHS vermindert sind, wenn CCL17 abwesend ist.

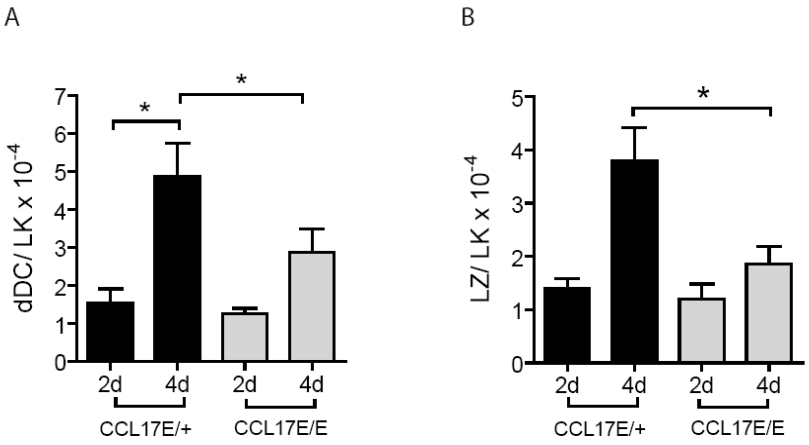


Abbildung 21: CCL17 wird für die Auswanderung der DC aus der Haut nach Sensibilisierung benötigt.
0.5% DNFB wurde auf die rasierte Rückenhaut von CCL17E/+ Mäusen (schwarzer Balken) und CCL17E/E Mäusen (grauer Balken) aufgetragen. 2 und 4 Tage später wurden die drainierenden LK auf die Anzahl der dDC (A) und LZ (B) analysiert. Es wurden die Mittelwerte± SEM von drei unabhängigen Experimenten berechnet und aufgetragen.

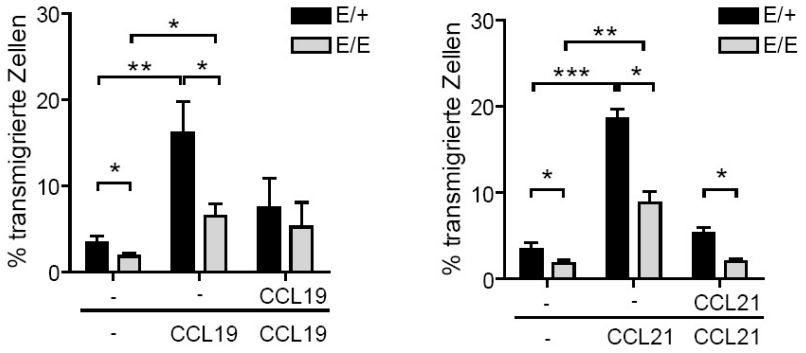
3.3.8 Die Migration der DC in Richtung CCR7 Liganden ist abhängig von CCL17

Die Auswanderung von DC aus dem peripheren Gewebe und deren Eintritt in die Lymphbahnen ist ein komplexer Prozess, welcher maßgeblich von CCR7 und seinen Liganden abhängt und gesteuert wird [Kellermann et al., 1999; Ohl et al., 2004; Riol-Blanco et al., 2005]. Es stellte sich daher die Frage, ob CCL17 am Prozess der Wanderung von DC in Richtung eines CCR7 Liganden beteiligt ist. Es wurden aus Knochenmark (KM) von CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen DC *in vitro* generiert (KM-DC) und über Nacht mit LPS stimuliert. Nur reife DC exprimieren den funktionellen CCR7 Rezeptor und reagieren auf CCR7 Liganden. Anschließend wurde das Wanderungsverhalten in einem Transwellsystem untersucht. Die DC wurden ins obere Well gegeben und ein CCR7 Ligand in das untere Well appliziert. Bei zielgerichteter Wanderung transmigrieren die DC durch eine Membran mit Poren ins untere Well, deren Zellzahl sich quantifizieren lässt. Es zeigte sich überraschenderweise, dass, im Gegensatz zu normalen KM-DC, die Abwesenheit von CCL17 zu einem starken Defizit bei der Transmigration, sowohl in Richtung von CCL19 als auch von CCL21, führte (Abb. 22A).

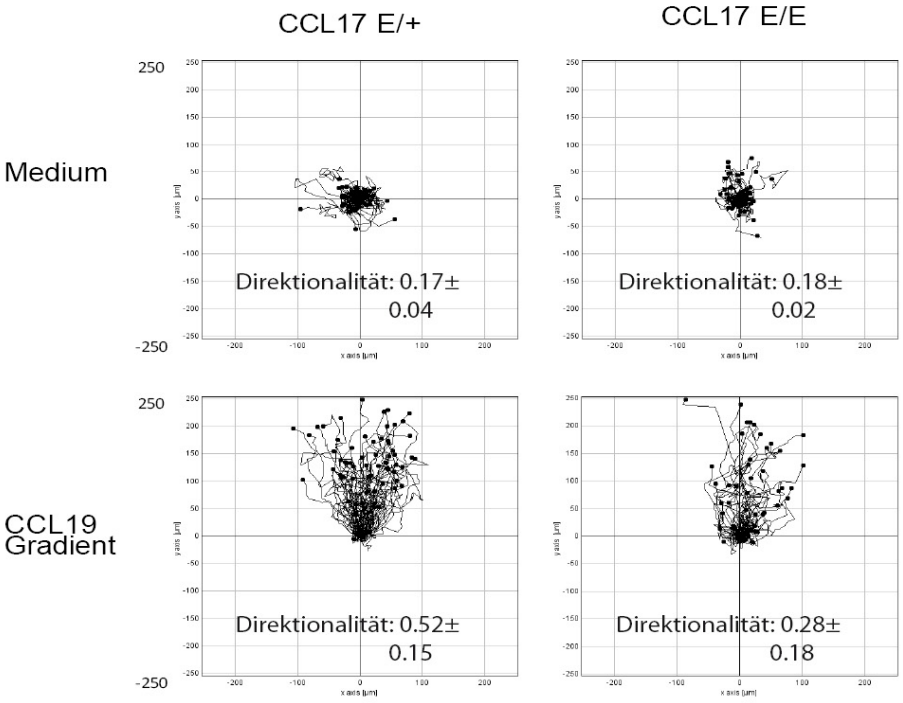
Dennoch war die Wanderung in Richtung eines CCR7 Liganden in den CCL17-defizienten Zellen im Vergleich zur spontanen Wanderung ohne weiteren Chemokinzusatz deutlich erhöht. Interessanter Weise hatten die CCL17-defizienten DC im Vergleich zu den CCL17E/+ DC auch eine reduzierte spontane Wanderung, welche erkennbar wurde, wenn die DC ohne weitere Chemokine inkubiert wurden (Abb. 22A). Wenn die CCR7 Liganden sowohl im oberen als auch im unteren Well vorhanden sind, lässt sich untersuchen, ob allein die Anwesenheit des Chemokins auch Auswirkungen auf die Zellen hat. Solche Auswirkungen könnten Veränderung der Geschwindigkeit und Richtungswechsel sein. Es zeigte sich, dass auch der Prozess der sogenannten Chemokinese in den CCL17-defizienten DC reduziert ist (Abb. 22A).

Da die Wanderung von reifen DC durch das periphere Gewebe eine direkte Interaktion mit der extrazellulären Matrix beinhaltet [Friedl and Brocker, 2004; Koch et al., 2006], wurde auch die Wanderung von KM-DC am Mikroskop im 3D Collagen(Typ I)–Gel untersucht. Es wurden reife über Nacht mit LPS aktivierte KM-DC von CCL17E/E und CCL17E/+ Mäusen mit einer Kollagenlösung vermischt. Nachdem die Lösung polymerisiert war, wurde ein Gradient von CCL19 appliziert. Die Zellen wurden für 3h alle 5min fotografiert. Die Bilder wurden dann zu einer Filmsequenz zusammengefügt und mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Das Bewegungsmuster lässt sich, wie in Abbildung 22B zu sehen, graphisch darstellen. Wurde ein Chemokingradient mit CCL19 appliziert, so zeigten KM-DC von CCL17E/+ Mäusen eine starke Migration, sowie eine deutliche Direktionalität mit einem Wert von 0.52 ± 0.15 in Richtung CCL19. Der theoretische Idealwert liegt in der Praxis bei 0.7 und setzt sich aus der Fluglinie und dem tatsächlich zurück gelegten Weg zusammen. Sind die DC defizient für CCL17, so ist die Direktionalität in Richtung eines CCR7 Liganden auf 0.28 ± 0.18 gesunken. Auch der y – Vorwärts-Wanderungsindex (engl.: y Forward Migration Index - y FMI), der die gerichtete Bewegung entgegen eines Chemokingradienten entlang der y Achse beschreibt, war in den CCL17-defizienten DC um 50% reduziert (Abbildung 22C rechts). Die Durchschnitts-geschwindigkeit der CCL17-defizienten DC war ebenfalls deutlich reduziert im Vergleich zu CCL17E/+ Zellen (Abb. 22C links). Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass CCL17 essentiell für DC ist, um auf CCR7 Liganden mit einer effizienten Chemotaxis reagieren zu können.

A


% transmigrierte Zellen
30
20
10
0
E/+
E/E
*
**
*
*
-
-
CCL19
-
CCL19
CCL19
% transmigrierte Zellen
30
20
10
0
E/+
E/E
**
***
*
*
*
-
-
CCL21
-
CCL21
CCL21

B


CCL17 E/+
CCL17 E/E
Medium
CCL19 Gradient
Direktionalität: 0.17± 0.04
Direktionalität: 0.18± 0.02
Direktionalität: 0.52± 0.15
Direktionalität: 0.28± 0.18
250
-250

C

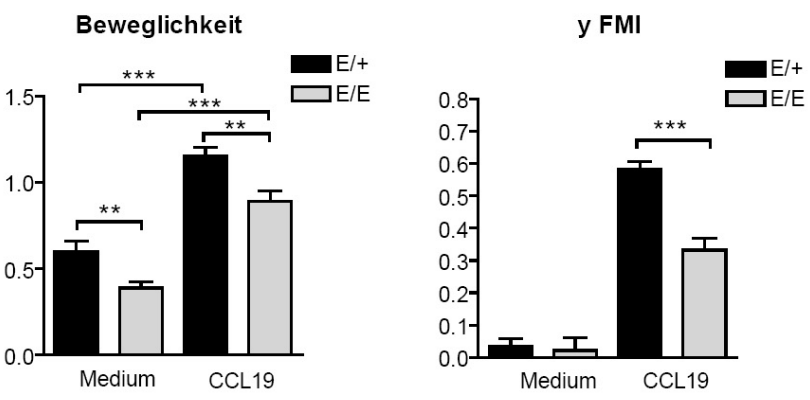

Beweglichkeit
y FMI
E/+
E/E
1.5
1.0
0.5
0.0
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
**
Medium
CCL19

Abbildung 22: DC besitzen in Abwesenheit von CCL17 nur eine eingeschränkte Fähigkeit in Richtung von CCR7 Liganden zu Wandern.

KM-DC von CCL17E/+ (E/+) und CCL17E/E (E/E) Mäusen wurden am sechsten Tag über Nacht mit 1µg/ml LPS behandelt. Die Zellen wurden in ein Transwell mit 8 µm großen Poren transferiert. Die Zellen wurden für 3h bei 37°C mit oder ohne CCL19 oder CCL21 (A) im unteren, oder oberen und unteren Well inkubiert. Die nach dieser Zeit im unteren Well angekommenen Zellen wurden blind ausgezählt. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten wurden vereint und die Mittelwerte ± SEM wurden berechnet.

Chemotaktische Wanderungsexperimente wurden in einer 3D Kollagenmatrix durchgeführt. LPS aktivierte KM-DC von CCL17E/+ (E/+) und CCL17E/E (E/E) Mäusen wurden mit einer Kollagen I –Lösung vermischt und ein Gradient von CCL19 (600 ng/ml) appliziert. Alle 5 min wurde 3 Stunden lang ein Bild generiert, welche dann zu einem Film zusammengefügt wurden und analysiert werden konnten. Gezeigt sind die Plots von 60 verfolgten Zellen/Probe (B) und deren Direktionalität in Richtung CCL19 (B), repräsentativ ein Experiment von drei. In (C) sind die Mittelwerte ± SEM der Geschwindigkeit und Wanderungsfähigkeit entlang der y-Achse (y FMI) von drei vereinten Experimenten gezeigt.

3.3.9 CCL17 reguliert die CCR7 Funktion ohne die CCR7 Expression zu verändern

In Abwesenheit von CCL17 reagieren DC weniger effizient auf CCR7 Liganden. Als Ursache wurde ein Einfluss von CCL17 auf die Expression von CCR7 angenommen. Um diese Hypothese zu testen, wurden unreife und reife DC mit einem Antikörper gegen CCR7 gefärbt und am FACS analysiert (Abb. 23A). Es zeigte sich, dass unter normalen Bedingungen CCR7 bereits auf unstimulierten KM-DC exprimiert wird (Abb. 23A, links). Diese Expression konnte aber weiter herauf reguliert werden, wenn die DC über Nacht mit LPS aktiviert wurden (Abb. 23A, rechts). Dies bedeutet, dass CCL17 nicht die Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche reguliert. Zusätzlich wurde die Expression von CCR4, Rezeptors von CCL17, untersucht. Bei unstimulierten DC von CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen wurden gleiche Mengen an CCR4 gefunden. Nach einer Aktivierung mit LPS war die Expression von CCR4 bei DC von CCL17-defizienten Tieren leicht erhöht im Vergleich zu den DC von CCL17E/+ Tieren (Abb. 23A, untere Reihe).

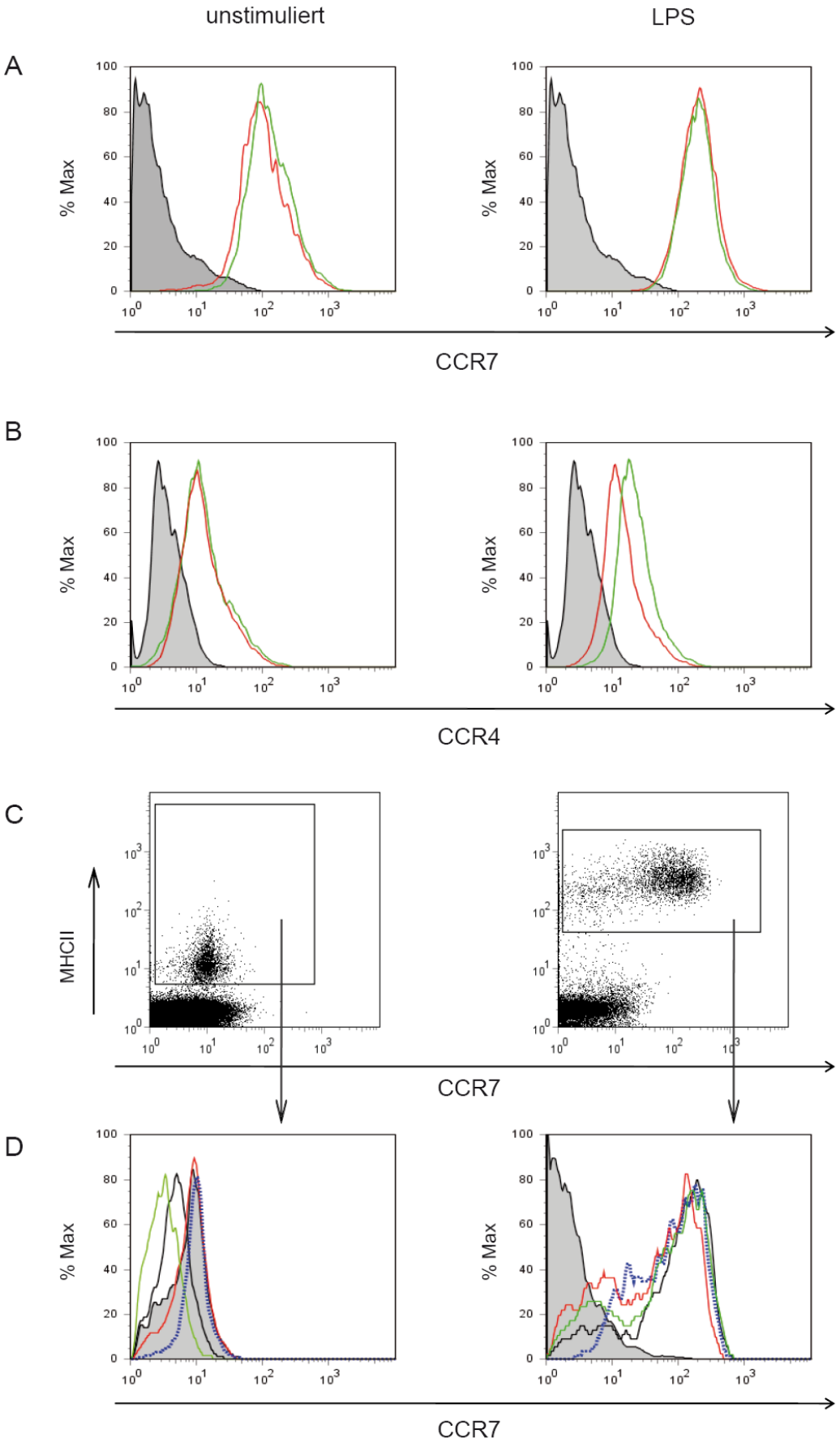

unstimuliert
LPS
A
% Max
CCR7
B
% Max
CCR4
C
MHCII
CCR7
D
% Max
CCR7

Abbildung 23: Einfluss von CCL17 auf die CCR7 und CCR4 Expression bei DC.

Unstimulierte und LPS-aktivierte (1µg/ml) KM-DC von CCL17E/E Mäuse (grüne Linie) und CCL17E/+ Mäuse (rote Linie) wurden gegen CCR7 (A) oder gegen CCR4 (B) gefärbt. Als Negativkontrolle für CCR4 wurden Milzzellen aus CCR4-Knockout Mäusen [Chvatchko et al., 2000] mit dem Antikörper gegen CCR4 gefärbt (grau schattierter Graph). Als Negativkontrolle für CCR7 wurden ungefärbte Zellen aufgenommen (grau schattierter Graph). Die gezeigten Daten repräsentieren ein Experiment von drei unabhängigen Experimenten. (C und D) LZ wurden von der dorsalen Haut von C57BL/6 (schwarze Linie), CCR4KO (blau gepunktete Linie), CCL17 E/+ Mäusen (grüne Linie) und CCL17E/E Mäusen (rote Linie) isoliert und gegen MHCII und CCR7 direkt im Anschluss (links) gefärbt oder erst nach einer über Nacht Kultur mit 1µg/ml LPS (rechts) gefärbt und analysiert. Der Graph in (D) zeigt die CCR7 Expression von MHCII+ Zellen, die in (C) markiert wurden.

Eine weitere Fragestellung war, ob LZ, die nicht den konventionellen DC entsprechen und sich von den DC einer KM-Kultur unterscheiden, eine differentielle CCR7 Expression aufweisen. Daher wurden die LZ von Wildtyp, CCL17E/+ und CCL17E/E Mäusen *ex vivo* auf eine Expression von CCR7 untersucht. Direkt nach der Isolierung war bei den MHCII+ Zellen der Epidermis keine CCR7 Expression auf der Zelloberfläche detektierbar. (Abb. 23B und 23C, links). Allerdings wurde nach einer über Nacht Inkubation mit LPS diese stark herauf reguliert, wobei keine Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den verschiedenen Mauslinien zu beobachten war. Ergänzend wurde die Expression von CCR7 bei CCR4-defizienten Mäusen gemessen, um zu erfahren, ob der CCR4 Signalweg an der CCR7 Expression beteiligt ist. Die Ergebnisse entsprachen aber denen der zuvor untersuchten Mauslinien. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die verminderte CCR7-abhängige Wanderung der CCL17-defizienten DC nicht das Resultat einer reduzierten Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche ist. Weiterhin scheinen weder CCR4 noch CCL17 die Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche zu regulieren.

4 Diskussion

4.1 Die Expressionsstärke von CD24a unterscheidet LZ von dDC

4.1.1 CD24a ist ein geeigneter Marker für LZ und dDC

Die Haut ist zusammen mit den Schleimhäuten das größte Immunorgan im Körper. Sie bildet eine erste Barriere gegen Umwelteinflüsse. Allerdings ist sie auch ständig potentiellen Pathogenen und Fremdstoffen ausgesetzt. Obwohl das *Stratum Corneum*, oder auch Hornschicht, ein Eindringen in den Körper verhindert, reichen schon kleinste Kratzer und Verletzungen der Epithelbarriere aus, damit Antigene in den Körper gelangen. In der normalen Haut kommen drei verschiedene DC Subtypen vor, die eidermalen LZ, die plasmacytoiden DC und die myeloiden dDC. Letztere sind nochmals zu unterscheiden zwischen Langerin+ und Langerin-negativen DC. Es wird angenommen, dass die DC der Haut unterschiedliche Aufgaben haben. Sie vermitteln Toleranz, aktivieren das angeborene oder auch das adaptive Immunsystem und tragen so zu einer gut funktionierenden Immunantwort bei. Um diese DC Subtypen bei den verschiedenen Immunreaktionen der Haut näher zu untersuchen, bedarf es einer Isolierung dieser DC und einer genauen *ex vivo* phänotypischen und funktionellen Charakterisierung. Bisher war der extra- und intrazelluläre Marker Langerin die beste Möglichkeit LZ und Langerin+ dDC zu identifizieren. Allerdings wird Langerin während der Reifung internalisiert und kann oberflächlich nicht durch Antikörper markiert werden. Nur eine intrazelluläre Färbung ermöglicht eine Identifizierung, würde aber auch durch die Fixierung der Zellen ein Absterben dieser nach sich führen. Lebende LZ könnten nicht isoliert und angereichert werden und stehen demnach nicht für *ex vivo* Experimente zur Verfügung. Hinzu kommt, dass die dDC bisher schwer zu identifizieren waren (Valladeau and Saeland, 2005), da LZ und dDC überlappende Phänotypen und Funktionen haben (Anjuere et al., 1999; Valladeau et al., 2002).

Die im ersten Teil dieser Promotionsarbeit vorgestellte Methode beschreibt, wie sich LZ und dDC innerhalb der Haut, sowie im drainierenden LK aufgrund von MHCII und CD24a

unterscheiden lassen. Besonders für die Haut ist diese Beobachtung wichtig, da der klassische DC Marker CD11c durch den Verdau der Haut mit Trypsin zerstört wird. Eine solche Trypsinsensitivität konnte auch für den Endozytoserezeptor DEC205 beschrieben werden [Anjuere et al., 1999], welcher normaler Weise stärker von LZ als von dDC exprimiert wird. In der hier vorgelegten Arbeit konnte zum ersten Mal eine enge Korrelation von CD24a mit Langerin, sowie eine differentielle Expression von CD24a in LZ versus dDC aufgezeigt werden. In der Epidermis haben alle LZ eine hohe MHCII und CD24a Expression. Bei der Dermis zeigte eine zusätzliche Färbung gegen CD103, dass die Langerin+ Zellen nicht nur eine hohe CD24a Expression aufweisen, sondern auch zur Hälfte CD103+ und zur Hälfte CD103-negativ sind. M. Merad beschrieb, dass die in der Dermis residierenden Langerin+ DC eine CD103 Expression besitzen [Merad et al., 2008]. Weiterhin zeigte sie, dass die LZ, die aus der Epidermis kommen oder in die Epidermis hinein wandern, keine CD103 Expression aufweisen. Zusammenfassend bedeutet dies, dass mit einer Dreifach-Färbung gegen MHCII, CD24a und CD103 die LZ der Epidermis und Dermis am FACS eindeutig identifizierbar sind. Die Langerin-negativen DC in der Dermis haben keine oder nur eine sehr niedrige CD24a Expression und sind zu über 80% negativ für CD103. Die anderen CD24a-positiven Zellen in der Haut, wie aktivierte T-Zellen und Keratinozyten, sind MHCII-negativ und daher sehr gut von den LZ zu unterscheiden.

Auch im drainierenden LK der Haut korrelierte die Expression von Langerin mit einer hohen CD24a Expression. Da aber auch die B-Zellen eine hohe CD24a Expression besitzen, ist die Verwendung eines DC Markers wie CD11c hilfreich. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach der Applikation von FITC auf die Haut alle FITC+ Zellen im drainierenden LK eine hohe MHCII Expression aufweisen. Dieses Ergebnis deckte sich mit dem von Ohl et al. [Ohl et al., 2004], wo gezeigt wurde, dass unter normalen Bedingungen die MHCII-hoch exprimierenden Zellen DC sind, die aus der Haut stammen. Auch in der Milz und im mesenterialen LK können Langerin+ Zellen gefunden werden. Sie sind allerdings nicht mit den LZ aus der Epidermis der Haut verwandt (Anjuere et al., 1999; Valladeau et al., 2002; Stoitzner et al., 2003; Kissenpfennig et al., 2005). Zudem fehlt in diesen Organen die Population der DC, die eine hohe MHCII Expression aufweisen. Daher dienten die Zellen des mesenterialen LK als Negativkontrolle bei der FITC-Applikation, da keine Haut DC in diesem von der Haut weit entfernten Organ nachzuweisen sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für eine Identifizierung der Haut-DC im drainierenden LK CD11c und MHCII ausreichen. Die zusätzliche Verwendung von CD24a ermöglicht eine einfache Unterscheidung der DC aus der Haut in LZ und dDC. Möchte man wissen, ob die Langerin+ oder auch CD24-hoch exprimierenden Zellen der Epidermis oder der Dermis entstammen, so ist eine Färbung gegen CD103 nötig, denn Langerin und auch CD24a können dies nicht darstellen. Einige aus „dem Blut stammende DC“ sind auch als Langerin+ beschrieben worden [Kissenpfennig et al., 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass bei ihnen die Langerinexpression ebenfalls mit einer hohen CD24a Expression korrelierte. Allerdings gab es auch Langerin-negative Zellen, die eine hohe CD24a Expression besaßen. Dennoch kann bei der Analyse der DC aus der Haut, die DC Population, welche aus dem Blut stammt, leicht ausgeschlossen werden, da sie keine sehr hohe MHCII Expression aufweist.

4.1.2 Wanderungskinetik von CD24a exprimierenden LZ und dDC

Eine alternative Färbemethode für die DC der Haut im LK wurde von Ruedl et al. vorgestellt [Ruedl et al., 2000]. Sie zeigte, dass sich die LZ im LK aufgrund einer hohen CD11c Färbung mit CD40 von den anderen DC unterscheiden lassen. Zur damaligen Zeit war der Langerin-Antikörper noch nicht entwickelt. Es wurden daher in der hier vorgelegten Arbeit die damaligen Ergebnisse mit einer Langerin- und auch CD24a-Färbung überprüft. Nach der Applikation von FITC auf die Haut konnte bestätigt werden, dass alle FITC-positiven Zellen innerhalb der CD40-hoch CD11c+ Population und der CD40-hoch CD11c-hoch exprimierenden Population lagen. Allerdings war es nicht möglich dDC von LC aufgrund einer differentiellen Expression von CD11c zu unterscheiden. Die Verwendung von Langerin und CD24a zeigte, dass in der Population der hohen CD11c und hohen CD40 Expression über 70% der Zellen Langerin sowie CD24a positiv waren. Allerdings waren nach 4 Tagen FITC Applikation auch fast 50% der Zellen in der Population mit einem niedrigeren CD11c Level positiv für Langerin und CD24a. Offen bleibt, ob dies die residierenden Langerin+ DC der Dermis sind. Eine weitere Färbung gegen CD103 könnte mehr Klarheit darüber verschaffen. Zudem erforderte die Methode nach Ruedl et al. eine Dichtezentrifugation, um die DC der Haut anzureichern. Abgesehen von dem Zellverlust, den diese Art der Anreicherung mit sich

führt, könnte diese Behandlung auch zu einer veränderten Expression von Oberflächenproteinen, wie CD11c auf den LZ führen. Diese Zellen wären dann der „falschen“ Population zugeordnet.

4.1.3 Funktion von CD24a

Bisher ist über die Funktion von CD24a immer noch wenig bekannt. 1994 konnten Enk und Katz zeigen, dass CD24a eine kostimulatorische Funktion bei LZ hat, um Th1-Immunreaktionen der Haut zu vermitteln [Enk and Katz, 1994]. Später zeigte sich, das CD24a nicht nur von hämatopoetischen Zellen, sondern auch von Gehirnzellen und von einer Reihe an Epithelzellen gebildet wird (Shirasawa et al., 1993; Poncet et al., 1996; Magnoldo and Barrandon, 1996; Maric et al., 1996.). Inzwischen findet CD24a immer mehr Beachtung in der Tumorbiologie, da es an der Zelladhäsion und Metastasierung beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass CD24a als Ligand für P-Selektine dient (Aigner et al., 1997). Friedrichs et al. fanden, dass Tumorzellen die Blutgefäße durchbrechen können, indem deren CD24a Epitop an P-Selektin der Epithelzelle bindet [Friederichs et al., 2000]. Damit wird die Metastasierung durch CD24a gefördert. Tatsächlich konnte eine hohe CD24 Expression auf Tumorzellen mit einer schlechten Prognose und Überlebensrate assoziiert werden [Kristiansen et al., 2002; Kristiansen et al., 2004; Kristiansen et al., 2003]. Auch bei den LZ und den dDC konnte nach der Aktivierung und Wanderung zum LK eine deutlich erhöhte Expression an CD24a gezeigt werden. Die CD24a Expression könnte im direkten Zusammenhang mit Migrations- oder Homing-Vorgängen stehen, da gerade die Gefäße der Haut eine konstitutive Expression an E- und P-Selektinen aufweisen [Robert et al., 1999]. Es wäre vorstellbar, dass CD24a den Eintritt der LZ und dDC in die Haut, sowie nach Aktivierung, deren Verlassen aus der Haut steuert. Für die Langerin+ dDC konnte bereits gezeigt werden, dass diese in Abhängigkeit von der Bindung an E- und P-Selektin aus dem Blut in die Haut rekrutiert werden [Ginhoux et al., 2007]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Höhe der CD24a Expression in Kombination mit MHCII ein Unterscheidungsmarker für Haut-residierende LC und dDC, sowie auch von aktivierten LC und dDC im hdLK ist. Diese Methode

ist sehr einfach und erlaubt es elegant die Biologie der LZ und dDC *ex vivo* näher zu analysieren.

4.2 CCL17 in allergischen Immunreaktionen der Haut

Allergische Immunreaktionen der Haut können mit CHS Reaktionen experimentell an Mäusen untersucht werden. Bisher konnte keine direkte Verbindung zwischen der epikutanen Exposition von einem Allergen und der Sezernierung von CCL17 hergestellt werden. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression von CCL17 innerhalb der Haut durch das Hapten DNFB induziert wird. Es wurde bereits gezeigt, dass die Applikation von einem Hapten zur Stimulierung von Keratinozyten und zur Aktivierung und Reifung von LZ führt [Aiba and Katz, 1990]. Nur reife DC sind in der Lage CCL17 zu Sezernieren. Außerdem wurden bei CCL17-defizienten Mäusen geringere Ohrschwellungen und damit auch verminderte Immunantworten gegen die Haptene DNFB und FITC beobachtet. CCL17 spielt demnach eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen der Haut.

4.2.1 Funktion von CCL17 bei der Pathogenese von AD

Leukozyten gelangen aus dem Blut in die lymphoiden Organe, sowie in periphere Gewebe, indem sie einem Gradienten von Chemokinen folgen. Diese werden konstitutiv oder nur während Entzündungsreaktionen sezerniert [Homey et al., 2006; Lieberam and Forster, 1999]. Chemokine sind dafür bekannt, dass sie bei entzündlichen Hautreaktionen eine stimulierende Wirkung haben können. Bei der AD sind die Chemokine CCL11, CCL17, CCL18, CCL22, CCL26, CCL27 und CX3CL1 direkt mit dem Schweregrad der Krankheit assoziiert. In dieser Arbeit wurde die Funktion von CCL17 im Mausmodel der AD näher untersucht. Es wurde ein Modellallergen OVA chronisch auf die gereizte Haut von Mäusen mit einer CCL17-Defizienz sowie bei normalen Mäusen aufgetragen. Die Analysen ergaben, dass die

Abwesenheit von CCL17 zu einer starken Linderung der Symptome der AD führt. CCL17 war bisher dafür bekannt präferentiell Th2-Zellen anzulocken [Imai et al., 1996; Lieberam and Forster, 1999]. Diese Zellen sezernieren nach der Erkennung ihres Allergens vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine fördern die Entwicklung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen und die Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen und eosinophile Granulozyten. Daher stehen die Th2-Immunantworten in enger Assoziation mit allergischen Reaktionen. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CCL17 die Th2- aber auch Th1-Zytokin-Expression in der behandelten Haut und im hdLK stark vermindert ist. Zusätzlich hatten CCL17-defiziente Mäuse im Vergleich zu CCL17E/+ Mäusen in der Haut eine reduzierte Anzahl an Th2-Effektor-Zellen, Mastzellen und eosinophile Granulozyten, wenn mit OVA sensibilisiert wurde. Die verringerte Einwanderung von CD4+ T-Zellen ist aber wahrscheinlich eher das Resultat einer reduzierten Aktivierung von T-Zellen im hdLK, da in den CCL17-defizienten Tieren weniger DC aus der Haut in den hdLK gelangen und so weniger naïve T-Zellen aktiviert und Th1- und Th2-Effektor-T-Zellen differenziert werden. Dennoch könnte die Abwesenheit von CCL17 auch Auswirkungen auf die Rekrutierung von aktivierten und CCR4-exprimierenden T-Zellen haben. Dies erscheint aber wenig wahrscheinlich, denn es konnte bereits an Memory T-Zellen gezeigt werden, dass in der Haut redundant zum CCR4 Signalweg der CCR10/CCL27 Signalweg wirken kann [Reiss et al., 2001]. Die reduzierte Effektor-T-Zell Generierung führte auch zu einer deutlich verminderten antigenspezifischen Immunglobulinbildung. Besonders IgE ist eins der klassischen Kennzeichen der extrinsischen AD. Die Abwesenheit von CCL17 hatte eine starke Reduzierung des IgE-Titers zur Folge. Die FcεRI Rezeptoren werden durch einen hohen IgE-Spiegel aufreguliert. In den CCL17-defizienten Mäusen sind allerdings weniger FcεRI exprimierende Zellen in der Haut zu detektieren. Zusammenfassend kann man sagen, dass das Chemokin CCL17 eine wichtige Rolle bei der Initiierung einer allergischen Reaktion einnimmt. Da die Abwesenheit von CCL17 zu einer deutlichen Linderung der Krankheitssymptome der AD führt, ist CCL17 ein geeignetes Zielmolekül für die Entwicklung von neuen Medikamenten und spezifischen Inhibitoren. Eine lokale Applikation von einem epikutan aufgetragenen Inhibitor von CCL17 wäre eine vielversprechende Maßnahme, um die Symptome zu lindern, oder sogar präventiv AD-Symptome zu verhindern.

4.2.2 CCL17 vermittelt die effiziente Wanderung von DC auf CCR7-Liganden

Weiterhin war es durch diese Arbeit zum ersten Mal möglich, die Sezernierung von CCL17 mit der Wanderung von DC in einen Zusammenhang zu bringen. In den Mausmodellen für AD und CHS war die Auswanderung der DC, insbesondere der LZ aus der Haut zu den drainierenden LK, deutlich reduziert, wenn CCL17-defiziente Tiere verwendet wurden. Diese neuartige Beobachtung konnte durch das Filmen der Migration von KM-DC *in vitro* weiter untermauert werden. CCL17 wird benötigt, damit DC effizient auf CCR7-Liganden reagieren können.

Die molekularen Mechanismen, welche die DC Wanderung aus der Haut in den drainierenden LK regulieren, sind bisher nur teilweise verstanden. Die Stimulierung von CCR7 ist sowohl für die Migration im Normalzustand, als auch unter inflammatorischen Bedingungen essentiell. Nach der Reifung müssen DC CCR7 heraufregulieren [Granucci et al., 1999], um in die dermalen afferenten lymphatischen Bahnen eintreten zu können. Lymphatische Endothelzellen und Stromazellen im LK [MartIn-Fontecha et al., 2003; Saeki et al., 1999; Vassileva et al., 1999] exprimieren die CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 konstitutiv [Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998b; Sozzani et al., 1998]; deren Gradienten induzieren dann bei reifen DC eine gerichtete Migration. In Abwesenheit von CCR7 verbleiben DC und LZ in der Dermis und können sich weder im Ruhezustand noch unter inflammatorischen Bedingungen in den lymphatischen Geweben ansammeln [Ohl et al., 2004]. Im Gegensatz zu den CCR7-defizienten Mäusen, besitzen die CCL17E/E Mäuse im Ruhezustand allerdings normale Anteile an Haut-DC im drainierenden LK. Dies bedeutet, dass die Auswanderung aus der Haut im Ruhezustand nicht von CCL17 abhängt. Dafür spricht auch, dass in der gesunden Haut CCL17 nicht exprimiert wird [Alferink et al., 2003]. Erst eine Stimulierung mit TLR oder anderen Reifungssignalen, wie TSLP [Soumelis et al., 2002] und PGE2 [McIlroy et al., 2006], führen zur Induzierung der CCL17-Expression (REF).

Bisher galt die Wanderung der LZ aus der Epidermis in die Dermis als CCR7-unabhängig, da in CCR7-defizienten Mäusen nach Stimulierung eine normale Migration von der Epidermis in die Dermis zu beobachten war [Ohl et al., 2004]. Bei den CCL17-defizienten Mäusen konnte hingegen eine verminderte Mobilisierung der LZ aus der Epidermis gezeigt werden. Dieser

Unterschied könnte das Resultat unterschiedlicher Behandlungen der Mäuse sein. Alternativ könnte CCL17 aber auch Einfluss auf die LZ und deren Penetration durch die Basalmembran haben. Weiterhin ist bekannt, dass reife und unreife LZ CXCR4 exprimieren, um in Abhängigkeit von dem CXCR4 Liganden CXCL12 und unabhängig von CCR7 aus der Epidermis in die Dermis wandern zu können [Ouwehand et al., 2008]. Es stellt sich daher die Frage, ob CCL17 auch zur Funktion von CXCR4 beiträgt. In den CCL17-defizienten Mäusen konnte im Ruhezustand allerdings keine Akkumulation der LZ in der Epidermis beobachtet werden. Der Zusammenhang, der zwischen CCL17 und CXCR4 während einer Entzündungsreaktion bestehen könnte, wurde bisher noch nicht näher untersucht. Deutlich wurde in dieser Arbeit, dass die Wanderung der LZ aus der Haut CCL17-abhängig ist. Auch die Migration der dDC ist betroffen. Histologische Analysen zeigten aber, dass die Anzahl der CD11c+ DC in der Dermis nach chronischer OVA-Behandlung durch eine ständige zusätzliche Infiltration von DC aus dem Blut hoch gehalten wird. Histologisch war es aber nicht möglich, die verschiedenen DC-Populationen der Dermis zu unterscheiden. Im drainierenden LK konnte hingegen, aufgrund der differentiellen Expression von CD24a bei den DC der Haut, klar gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CCL17 sowohl die LZ als auch die dDC gleichermaßen von einer reduzierten Einwanderung betroffen sind. Im Mausmodell der allergischen Kontakthypersensitivitätsreaktion konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden. Nach Aktivierung mit DNFB gelangte im Vergleich zu CCL17E/+ Mäusen, in den CCL17E/E Mäusen nur eine reduzierte Anzahl von LZ und dDC in den hdLK. Dieser Befund erklärt auch die CHS Experimente von Alferink et al. [Alferink et al., 2003]. Die reduzierte Ohrschwellung nach der zweiten Immunisierung mit einem Hapten wurde wahrscheinlich nicht durch eine reduzierte Einwanderung der aktivierten T-Zellen, sondern durch eine geringere Auswanderung der DC vermittelt.

4.2.3 Mechanismus der Wirkungsweise von CCL17

Obwohl CCL19 und CCL21 ständig präsent sind, kann CCR7 nicht konstitutiv eine Zellwanderung in Richtung dieser Liganden zu vermitteln [Giordano et al., 2006; Hagnerud et

al., 2006; Scandella et al., 2004; Yen et al., 2008]. Dies konnte zum Einen für DC gezeigt werden, die *in vitro* in Abwesenheit von PGE2 differenziert wurden, sowie für CD47-defiziente DC. Beide exprimierten, wie die CCL17E/E DC auch, normale Spiegel an CCR7. Dennoch waren sie nicht in der Lage eine effiziente und direktionale Migration in Richtung von CCR7 Liganden zu vollführen. Allein die Anwesenheit von CCR7 auf der Zelloberfläche ist daher nicht ausreichend.

Proinflammatorische Moleküle wie PGE2 [Yen et al., 2008], Nitrit Oxide [Giordano et al., 2006] und wie hier gezeigt CCL17 sind nötig, um die CCR7 abhängige Wanderung zu verstärken. Man könnte spekulieren, dass die PGE2 Präsenz essentiell ist, um CCL17 zu induzieren, denn Arbeiten von McIlroy zeigten, dass PGE2 direkt die Expression von CCL17 induzieren kann [McIlroy et al., 2006]. Zudem dauert es mehrere Stunden bis der CCR7 Rezeptors von PGE2 erfolgreich sensibilisiert wurde, was für eine PGE2-stimulierte Induzierung weiterer Gene spricht.

Der molekulare Mechanismus, wie diese Faktoren auf CCR7 wirken, bleibt bisher aber noch unverstanden. Eine Möglichkeit ist, dass die Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR4 Rezeptor-heterodimere bilden. Ähnliches konnte bereits für CCR2/CCR5, CCR2/CXCR4 und CXCR4/CCR5 gezeigt werden. Auch für CXCR7 konnte gezeigt werden, dass es an CXCR4 bindet und ein Heterodimer bildet. Der konstitutive Signalweg von CXCR4/CXCL12 wird dadurch eingeschränkt. Die Bildung von Heterodimeren unter bestimmten Bedingungen ermöglicht demnach das ständig präsente Chemokine verschiedenste Funktionen ausüben.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die vermittelten CCL17/CCR4 Signale den CCR7 Rezeptor sensibilisieren. Eine solche Chemokinrezeptorsensibilisierung konnte ebenso *in vitro* für das konstitutive CXCR4 und das entzündliche CXCR3 gefunden werden. Beide Rezeptoren wirken bei plasmazytoiden DC (pDC) synergistisch, um deren Wanderung zu induzieren [Vanbervliet et al., 2003]. Sind nur CXCR3 Liganden zugegen, kann die Migration der pDC nicht stimuliert werden, obwohl der Rezeptor normal exprimiert wird. Ist der CXCR4 Ligand CXCL12 zusätzlich gegenwärtig, so ist die Migration der pDC deutlich erhöht.

In dieser Promotionsarbeit konnte nun zum ersten Mal ein *in vivo* Beweis für einen Zusammenhang zwischen einem induzierbaren und einem konstitutiv anwesenden Chemokin, während einer allergischen Reaktion erbracht werden.

Alternativ zu diesen Überlegungen könnten aber auch CCL17/CCR4-abhängige intrazelluläre Signale nötig sein, um Signaltransduktionselemente von CCR7 zu aktivieren.

Die Bindung von Liganden an Chemokinrezeptoren führt zur Aktivierung von *Gi*-Proteinen, welche das Enzym Phospholipase C (PLC) dazu bringt Posphatidylinositol (4,5)-bisphospaht (PIP2) in Inositol Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol zu spalten. Letzteres aktiviert die Protein Kinase C während IP3 die Freisetzung von Calcium vermittelt. Calcium wiederum fördert viele Signalkaskaden, die dann Zellfunktionen wie Chemotaxis, Degranulierung und die Expression von Adhäsionsmolekülen und Integrinen vermitteln. Die Abwesenheit von CCL17 hatte Auswirkungen auf die Chemotaktischen Eigenschaften der DC. Für zukünftige Analysen der molekularen Wirkungsweise von CCL17 wäre daher die Messung der Calcium-Freisetzung in An-und Abwesenheit von CCL17 eine aufschlussreiche Untersuchung. Aber auch die anderen Elemente der Signalkaskade gilt es zu untersuchen.

4.2.4 CCL17 und CCL22

CCL17 und CCL22 besitzen homologe Strukturen und beide adressieren denselben Rezeptor CCR4. Man nahm daher an, dass sie redundant wirken können. Dennoch zeigte die CCL17-Defizienz einen starken Phänotyp bei der Initiierung einer allergischen Immunantwort. Es wird deshalb deutlich, dass CCL22 die Funktion von CCL17 nicht ersetzen und kompensieren kann. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass der CCL17-Phänotyp noch ausgeprägter wäre, wenn CCL22 gleichzeitig auch abwesend ist.

Penna et al. konnten sogar zeigen, dass CCL17 und CCL22 gegensätzliche Funktionen ausüben können. Die Behandlung von DC mit 1,25-Dihydroxyvitamin D3 löste tolerogene Eigenschaften aus, da in myeloiden DC CCL17 runter und CCL22 herauf reguliert wurde [Penna et al., 2007]. Eine unterschiedliche Expression von CCL17 und CCL22 konnte auch in Patienten mit AD beobachtet werden. Hier wurden CCL17 und CCL18, welches nur beim Menschen gebildet wird, von den myeloiden DC coexprimiert. Die CCL22 Expression hingegen konnte nur mit pDC innerhalb der Dermis in Verbindung gebracht werden [Guttman-Yassky et al., 2007].

Weiterhin wurde von Curiel et al. gezeigt, dass eine stärkere Expression von CCL22 für ein verstärktes Einwandern von CCR4+ FoxP3+ regulatorischen T-Zellen sorgt [Curiel et al., 2004]. Man kann daher annehmen, dass eine CCL22 Expression eher die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen verursacht, während CCL17 die Auswanderung der DC und eine Th2 gerichtete Immunantwort fördert. Wie die zwei Chemokine innerhalb einer Zelle auf molekularer Ebene reguliert werden, bleibt aber offen.

4.2.5 CCL17 und TSLP

Anhand des Mausmodells für AD konnte gezeigt werden, dass die chronischer OVA-Applikation in Anwesenheit von CCL17 zu einer Auswanderung an LZ aus der Epidermis führt. Außerdem ist bekannt, dass die Wanderung der LZ aus der Epidermis in die darunter liegende Dermis mit einer erhöhten Expression von TSLP (thymic stromal lymphopoietin) innerhalb der Epidermis korreliert [Soumelis et al., 2002]. Interessanter Weise induziert TSLP die Reifung von DC und die Expression von CCL17 [Soumelis et al., 2002]. Eine Überexpression von TSLP in Keratinozyten von Mäusen führte zur Entwicklung von AD-ähnlichen Symptomen [Zhang et al., 2009]. Auch die transgene Expression von CCL17 in Keratinozyten konnte TH2-abhängige CHS, eine IgE Sezernierung und andere AD ähnliche Symptome induzieren [Tsunemi et al., 2006]. In TSLP-defizienten Tieren ist die Sezernierung von Th2-Zytokinen nach chronischer OVA-Behandlung der Haut, wie in dem hier vorgestellten Mausmodell für AD, deutlich vermindert. Allerdings zeigte die Abwesenheit von TSLP weder einen Einfluss auf die Wanderung von Effektor-T-Zellen in die Haut, noch einen Einfluss auf die Auswanderung von DC aus der Haut in den drainierenden LK [He et al., 2008]. Die Expression von CCL17 wurde in diesen Mäusen nicht untersucht. Es ist aber wahrscheinlich, dass eine TSLP-Defizienz keine großen Auswirkungen auf die CCL17-Sezernierung im AD Modell hat, da auch TNF□ und PGE2 die Expression induzieren können. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Auswanderung der DC in diesen Mäusen nicht beeinträchtigt war.

4.2.6 Ausblick

Diese Arbeit zeigte eine weitere bisher unbekannte Funktion von CCL17. Die von dem CCR7-CCR7Ligand vermittelte Wanderung ist deutlich effizienter wenn CCL17 zugegen ist. Die genauere molekulare Wirkungsweise von CCL17 auf den CCR7 Signalweg ist noch unverstanden und bedarf weiterer Untersuchungen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CCL17 und nach chronischer OVA-Behandlung die LZ in der Epidermis akkumulierten. Die Auswanderung aus dieser Hautschicht wird aber von CXCR4 gesteuert und ist unabhängig von CCR7. In Migrationsstudien soll daher untersucht werden, ob CCL17 auch auf den CXCR4 Signalweg wirkt.
In vitro generierte DC aus dem Knochenmark, welche eher den konventionellen DC entsprechen und nicht den LZ ähnlich sind, zeigten in Abwesenheit von CCL17 eine stark reduzierte Wanderungsgeschwindigkeit und Direktionalität. Auch andere Organe die im direkten Kontakt mit der Umwelt stehen, wie Lunge und Darm, besitzen DC, die CCL17 produzieren können. Die Lungenkrankheit Asthma, welche zu den atopischen Krankheiten gehört, konnte mit einem hohen CCL17-Spiegel assoziiert werden. Zusätzlich fand man bei allergischen Reaktionen gegen Nahrungsmittelbestandteile eine hohe Expression von Th2-Zytokinen im Darm, unter anderem aber auch CCL17 [Knight et al., 2007]. Es ist daher anzunehmen, dass der Einfluss von CCL17 auf die CCR7 gesteuerte Wanderung nicht spezifisch für die DC der Haut ist, sondern von allgemeiner Bedeutung im Immunsystem ist. Um dies genauer zu untersuchen müssen Mausmodelle für allergische Immunreaktionen des Darms und das Asthma Mausmodell mit den CCL17-defizienten Mäusen durchgeführt werden. Es zeigt sich dann, ob die Abwesenheit von CCL17 hier auch zur Linderung der Symptome führt.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CCL17 wichtige Rolle bei der Migration der DC aus der Haut spielt. Es ist vorstellbar, dass CCL17 essentiell ist, den CCR7 Rezeptor zu sensibilisieren, wenn die DC nicht in einem unreifen oder semi-reifen tolerogenen Zustand, sondern in einen reifen stimulierenden Zustand versetzt werden sollen. CCL17 wirkt daher als Sensor und Vermittler eines Entzündungsreizes. Es sorgt für

eine effiziente schnelle und gerichtete Wanderung der DC in den drainierenden LK, um dort naïve T-Zellen zu aktivieren. Außerdem konnte zuvor schon gezeigt werden, dass CCL17 CCR4+ T-Zellen anlockt. Bei der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen für die Behandlung der AD aber auch von anderen entzündlichen Immunreaktionen wurde bisher die Blockade des CCR4 Rezeptors angedacht. Hier konnte nun ein neues Zielmolekül bei der Entwicklung von Medikamenten und spezifischen Inhibitoren aufgezeigt werden. Eine lokale Applikation von einem epikutan aufgetragenen Inhibitor von CCL17 wäre eine vielversprechende Maßnahme, um die Symptome der AD zu lindern, oder sogar präventiv AD-Symptome zu verhindern. Es soll daher in Kooperation mit Prof. Dr. Michael Famulok ein Inhibitor generiert werden und dessen Wirkung zunächst am Mausmodell untersucht werden.

5 Referenzen

Aiba, S., and S.I. Katz, Phenotypic and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells, *J Immunol, 145*, 2791-6, 1990.

Albert, M.L., S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, and N. Bhardwaj, Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes, *J Exp Med, 188*, 1359-68, 1998.

Alferink, J., I. Lieberam, W. Reindl, A. Behrens, S. Weiss, N. Huser, K. Gerauer, R. Ross, A.B. Reske-Kunz, P. Ahmad-Nejad, H. Wagner, and I. Forster, Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen, *J Exp Med, 197*, 585-99, 2003.

Anjuere, F., P. Martin, I. Ferrero, M.L. Fraga, G.M. del Hoyo, N. Wright, and C. Ardavin, Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse, *Blood, 93*, 590-8, 1999.

Baekkevold, E.S., T. Yamanaka, R.T. Palframan, H.S. Carlsen, F.P. Reinholt, U.H. von Andrian, P. Brandtzaeg, and G. Haraldsen, The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment, *J Exp Med, 193*, 1105-12, 2001.

Baggiolini, M., Chemokines and leukocyte traffic, *Nature, 392*, 565-8, 1998.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka, Immunobiology of dendritic cells, *Annu Rev Immunol, 18*, 767-811, 2000.

Bennett, C.L., M. Noordegraaf, C.A. Martina, and B.E. Clausen, Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells, *J Immunol, 179*, 6830-5, 2007.

Bennett, C.L., E. van Rijn, S. Jung, K. Inaba, R.M. Steinman, M.L. Kapsenberg, and B.E. Clausen, Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity, *J Cell Biol, 169*, 569-76, 2005.

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

Bursch, L.S., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D.H. Kaplan, and K.A. Hogquist, Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells, *J Exp Med, 204*, 3147-56, 2007.

Carbone, F.R., G.T. Belz, and W.R. Heath, Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity, *Trends Immunol, 25*, 655-8, 2004.

Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau, GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells, *Nature, 360*, 258-61, 1992.

Chvatchko, Y., A.J. Hoogewerf, A. Meyer, S. Alouani, P. Juillard, R. Buser, F. Conquet, A.E. Proudfoot, T.N. Wells, and C.A. Power, A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock, *J Exp Med, 191*, 1755-64, 2000.

Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou, Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival, *Nat Med, 10*, 942-9, 2004.

de Saint-Vis, B., J. Vincent, S. Vandenabeele, B. Vanbervliet, J.J. Pin, S. Ait-Yahia, S. Patel, M.G. Mattei, J. Banchereau, S. Zurawski, J. Davoust, C. Caux, and S. Lebecque, A novel lysosome-associated

membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment, *Immunity, 9*, 325-36, 1998.

Dieu, M.C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J.M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux, Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites, *J Exp Med, 188*, 373-86, 1998.

Douillard, P., P. Stoitzner, C.H. Tripp, V. Clair-Moninot, S. Ait-Yahia, A.D. McLellan, A. Eggert, N. Romani, and S. Saeland, Mouse lymphoid tissue contains distinct subsets of langerin/CD207 dendritic cells, only one of which represents epidermal-derived Langerhans cells, *J Invest Dermatol, 125*, 983-94, 2005.

Ebner, S., A. Lenz, D. Reider, P. Fritsch, G. Schuler, and N. Romani, Expression of maturation-/migration-related molecules on human dendritic cells from blood and skin, *Immunobiology, 198*, 568-87, 1998.

Elias, P.M., Y. Hatano, and M.L. Williams, Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms, *J Allergy Clin Immunol, 121*, 1337-43, 2008.

Enk, A.H., and S.I. Katz, Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans' cells, *J Immunol, 152*, 3264-70, 1994.

Foti, M., F. Granucci, D. Aggujaro, E. Liboi, W. Luini, S. Minardi, A. Mantovani, S. Sozzani, and P. Ricciardi-Castagnoli, Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site, *Int Immunol, 11*, 979-86, 1999.

Friederichs, J., Y. Zeller, A. Hafezi-Moghadam, H.J. Grone, K. Ley, and P. Altevogt, The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells, *Cancer Res, 60*, 6714-22, 2000.

Friedl, P., and E.B. Brocker, Reconstructing leukocyte migration in 3D extracellular matrix by time-lapse videomicroscopy and computer-assisted tracking, *Methods Mol Biol, 239*, 77-90, 2004.

Gao, X.K., N. Nakamura, K. Fuseda, H. Tanaka, N. Inagaki, and H. Nagai, Establishment of allergic dermatitis in NC/Nga mice as a model for severe atopic dermatitis, *Biol Pharm Bull, 27*, 1376-81, 2004.

Ginhoux, F., M.P. Collin, M. Bogunovic, M. Abel, M. Leboeuf, J. Helft, J. Ochando, A. Kissenpfennig, B. Malissen, M. Grisotto, H. Snoeck, G. Randolph, and M. Merad, Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state, *J Exp Med, 204*, 3133-46, 2007.

Giordano, D., D.M. Magaletti, and E.A. Clark, Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19, *Blood, 107*, 1537-45, 2006.

Gombert, M., M.C. Dieu-Nosjean, F. Winterberg, E. Bunemann, R.C. Kubitza, L. Da Cunha, A. Haahtela, S. Lehtimaki, A. Muller, J. Rieker, S. Meller, A. Pivarcsi, A. Koreck, W.H. Fridman, H.W. Zentgraf, H. Pavenstadt, A. Amara, C. Caux, L. Kemeny, H. Alenius, A. Lauerma, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey, CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation, *J Immunol, 174*, 5082-91, 2005.

Granucci, F., E. Ferrero, M. Foti, D. Aggujaro, K. Vettoretto, and P. Ricciardi-Castagnoli, Early events in dendritic cell maturation induced by LPS, *Microbes Infect, 1*, 1079-84, 1999.

Grewe, M., C.A. Bruijnzeel-Koomen, E. Schopf, T. Thepen, A.G. Langeveld-Wildschut, T. Ruzicka, and J. Krutmann, A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis, *Immunol Today, 19*, 359-61, 1998.

Guttman-Yassky, E., M.A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, J. Whynot, I. Novitskaya, I. Cardinale, A. Haider, A. Khatcherian, J.A. Carucci, R. Bergman, and J.G. Krueger, Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis, *J Allergy Clin Immunol, 119*, 1210-7, 2007.

Hagnerud, S., P.P. Manna, M. Cella, A. Stenberg, W.A. Frazier, M. Colonna, and P.A. Oldenborg, Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration, *J Immunol, 176*, 5772-8, 2006.

Hamada, K., N. Takuwa, K. Yokoyama, and Y. Takuwa, Stretch activates Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells through mechanisms involving autocrine ATP stimulation of purinoceptors, *J Biol Chem, 273*, 6334-40, 1998.

Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig, Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo, *J Exp Med, 194*, 769-79, 2001.

He, R., M.K. Oyoshi, L. Garibyan, L. Kumar, S.F. Ziegler, and R.S. Geha, TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*, 11875-80, 2008.

Hemmi, H., M. Yoshino, H. Yamazaki, M. Naito, T. Iyoda, Y. Omatsu, S. Shimoyama, J.J. Letterio, T. Nakabayashi, H. Tagaya, T. Yamane, M. Ogawa, S. Nishikawa, K. Ryoke, K. Inaba, S. Hayashi, and T. Kunisada, Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells, *Int Immunol, 13*, 695-704, 2001.

Homey, B., M. Steinhoff, T. Ruzicka, and D.Y. Leung, Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation, *J Allergy Clin Immunol, 118*, 178-89, 2006.

Imai, T., T. Yoshida, M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki, and O. Yoshie, Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector, *J Biol Chem, 271*, 21514-21, 1996.

Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R.M. Steinman, Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *J Exp Med, 176*, 1693-702, 1992.

Jakob, T., J. Ring, and M.C. Udey, Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin, *J Allergy Clin Immunol, 108*, 688-96, 2001.

Jin, H., R. He, M. Oyoshi, and R.S. Geha, Animal models of atopic dermatitis, *J Invest Dermatol, 129*, 31-40, 2009.

Kabashima, K., N. Shiraishi, K. Sugita, T. Mori, A. Onoue, M. Kobayashi, J. Sakabe, R. Yoshiki, H. Tamamura, N. Fujii, K. Inaba, and Y. Tokura, CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells, *Am J Pathol, 171*, 1249-57, 2007.

Kakinuma, T., K. Nakamura, M. Wakugawa, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, H. Torii, A. Asahina, N. Onai, K. Matsushima, and K. Tamaki, Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity, *J Allergy Clin Immunol, 107*, 535-41, 2001.

Kalish, R.S., J.A. Wood, and A. LaPorte, Processing of urushiol (poison ivy) hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells in vitro, *J Clin Invest, 93*, 2039-47, 1994.

Kaplan, D.H., M.C. Jenison, S. Saeland, W.D. Shlomchik, and M.J. Shlomchik, Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity, *Immunity, 23*, 611-20, 2005.

Karasuyama, H., and F. Melchers, Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors, *Eur J Immunol, 18*, 97-104, 1988.

Kellermann, S.A., S. Hudak, E.R. Oldham, Y.J. Liu, and L.M. McEvoy, The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells, *J Immunol, 162*, 3859-64, 1999.

Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C.H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust, and B. Malissen, Dynamics and function of

Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells, *Immunity, 22*, 643-54, 2005.

Knight, A.K., A.B. Blazquez, S. Zhang, L. Mayer, H.A. Sampson, and M.C. Berin, CD4 T cells activated in the mesenteric lymph node mediate gastrointestinal food allergy in mice, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 293*, G1234-43, 2007.

Kobayashi, Y., Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens, *Immunology, 90*, 496-501, 1997.

Koch, S., K. Kohl, E. Klein, D. von Bubnoff, and T. Bieber, Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration, *J Allergy Clin Immunol, 117*, 163-8, 2006.

Kristiansen, G., C. Denkert, K. Schluns, E. Dahl, C. Pilarsky, and S. Hauptmann, CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival, *Am J Pathol, 161*, 1215-21, 2002.

Kristiansen, G., C. Pilarsky, J. Pervan, B. Sturzebecher, C. Stephan, K. Jung, S. Loening, A. Rosenthal, and M. Dietel, CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer, *Prostate, 58*, 183-92, 2004.

Kristiansen, G., K. Schluns, Y. Yongwei, C. Denkert, M. Dietel, and I. Petersen, CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients, *Br J Cancer, 88*, 231-6, 2003.

Larsen, C.P., R.M. Steinman, M. Witmer-Pack, D.F. Hankins, P.J. Morris, and J.M. Austyn, Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants, *J Exp Med, 172*, 1483-93, 1990.

Lieberam, I., and I. Forster, The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells, *Eur J Immunol, 29*, 2684-94, 1999.

Liu, K., T. Iyoda, M. Saternus, Y. Kimura, K. Inaba, and R.M. Steinman, Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ, *J Exp Med, 196*, 1091-7, 2002.

Luther, S.A., H.L. Tang, P.L. Hyman, A.G. Farr, and J.G. Cyster, Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse, *Proc Natl Acad Sci U S A, 97*, 12694-9, 2000.

Lutz, M.B., N. Kukutsch, A.L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler, An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow, *J Immunol Methods, 223*, 77-92, 1999.

MartIn-Fontecha, A., S. Sebastiani, U.E. Hopken, M. Uguccioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming, *J Exp Med, 198*, 615-21, 2003.

McIlroy, A., G. Caron, S. Blanchard, I. Fremaux, D. Duluc, Y. Delneste, A. Chevailler, and P. Jeannin, Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells, *Immunology, 117*, 507-16, 2006.

Medoff, B.D., S.Y. Thomas, and A.D. Luster, T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs, *Annu Rev Immunol, 26*, 205-32, 2008.

Medzhitov, R., and C.A. Janeway, Jr., An ancient system of host defense, *Curr Opin Immunol, 10*, 12-5, 1998.

Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin, Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells, *Nat Rev Immunol, 8*, 935-47, 2008.

Mizumoto, N., M.E. Mummert, D. Shalhevet, and A. Takashima, Keratinocyte ATP release assay for testing skin-irritating potentials of structurally diverse chemicals, *J Invest Dermatol, 121*, 1066-72, 2003.

Nakano, H., and M.D. Gunn, Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation, *J Immunol, 166*, 361-9, 2001.

Novak, N., New insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis, *Allergy, 64*, 265-75, 2009.

Novak, N., T. Bieber, and D.Y. Leung, Immune mechanisms leading to atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol, 112*, S128-39, 2003.

Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Forster, CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions, *Immunity, 21*, 279-88, 2004.

Okamoto, H., K. Koizumi, H. Yamanaka, T. Saito, and N. Kamatani, A role for TARC/CCL17, a CC chemokine, in systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol, 30*, 2369-73, 2003.

Ouwehand, K., S.J. Santegoets, D.P. Bruynzeel, R.J. Scheper, T.D. de Gruijl, and S. Gibbs, CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis, *Eur J Immunol, 38*, 3050-9, 2008.

Padovan, E., R.M. Landmann, and G. De Libero, How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system, *Trends Immunol, 28*, 308-14, 2007.

Peh, S.C., L.H. Kim, and S. Poppema, TARC, a CC chemokine, is frequently expressed in classic Hodgkin's lymphoma but not in NLP Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and most cases of anaplastic large cell lymphoma, *Am J Surg Pathol, 25*, 925-9, 2001.

Penna, G., S. Amuchastegui, N. Giarratana, K.C. Daniel, M. Vulcano, S. Sozzani, and L. Adorini, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells, *J Immunol, 178*, 145-53, 2007.

Pierre, P., S.J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R.M. Steinman, and I. Mellman, Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells, *Nature, 388*, 787-92, 1997.

Poulin, L.F., S. Henri, B. de Bovis, E. Devilard, A. Kissenpfennig, and B. Malissen, The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells, *J Exp Med, 204*, 3119-31, 2007.

Probst, H.C., J. Lagnel, G. Kollias, and M. van den Broek, Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance, *Immunity, 18*, 713-20, 2003.

Reiss, Y., A.E. Proudfoot, C.A. Power, J.J. Campbell, and E.C. Butcher, CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin, *J Exp Med, 194*, 1541-7, 2001.

Riol-Blanco, L., N. Sanchez-Sanchez, A. Torres, A. Tejedor, S. Narumiya, A.L. Corbi, P. Sanchez-Mateos, and J.L. Rodriguez-Fernandez, The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed, *J Immunol, 174*, 4070-80, 2005.

Robert, C., R.C. Fuhlbrigge, J.D. Kieffer, S. Ayehunie, R.O. Hynes, G. Cheng, S. Grabbe, U.H. von Andrian, and T.S. Kupper, Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance, *J Exp Med, 189*, 627-36, 1999.

Romagnani, S., Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation, *Mol Immunol, 38*, 881-5, 2002.

Romani, N., S. Holzmann, C.H. Tripp, F. Koch, and P. Stoitzner, Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis, *Apmis, 111*, 725-40, 2003.

Ruedl, C., P. Koebel, M. Bachmann, M. Hess, and K. Karjalainen, Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes, *J Immunol, 165*, 4910-6, 2000.

Ruedl, C., C. Rieser, G. Bock, G. Wick, and H. Wolf, Phenotypic and functional characterization of CD11c+ dendritic cell population in mouse Peyer's patches, *Eur J Immunol, 26*, 1801-6, 1996.

Saeki, H., A.M. Moore, M.J. Brown, and S.T. Hwang, Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes, *J Immunol, 162*, 2472-5, 1999.

Saeki, H., and K. Tamaki, Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases, *J Dermatol Sci, 43*, 75-84, 2006.

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia, Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J Exp Med, 182*, 389-400, 1995.

Sallusto, F., and A. Lanzavecchia, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha, *J Exp Med, 179*, 1109-18, 1994.

Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C.R. Mackay, Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses, *Immunol Today, 19*, 568-74, 1998a.

Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function, *Eur J Immunol, 29*, 1617-25, 1999.

Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia, Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation, *Eur J Immunol, 28*, 2760-9, 1998b.

Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, and J.L. Rodriguez-Fernandez, The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells, *J Immunol, 176*, 5153-9, 2006.

Scandella, E., Y. Men, D.F. Legler, S. Gillessen, L. Prikler, B. Ludewig, and M. Groettrup, CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2, *Blood, 103*, 1595-601, 2004.

Schuler, G., N. Romani, and R.M. Steinman, A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells, *J Invest Dermatol, 85*, 99s-106s, 1985.

Schwarzenberger, K., and M.C. Udey, Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ, *J Invest Dermatol, 106*, 553-8, 1996.

Segura, E., and J.A. Villadangos, Antigen presentation by dendritic cells in vivo, *Curr Opin Immunol, 21*, 105-10, 2009.

Shimada, Y., K. Takehara, and S. Sato, Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis, *J Dermatol Sci, 34*, 201-8, 2004.

Shortman, K., and S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development, *Nat Rev Immunol, 7*, 19-30, 2007.

Song, T.W., M.H. Sohn, E.S. Kim, K.W. Kim, and K.E. Kim, Increased serum thymus and activation-regulated chemokine and cutaneous T cell-attracting chemokine levels in children with atopic dermatitis, *Clin Exp Allergy, 36*, 346-51, 2006.

Soumelis, V., P.A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R.A. Kastelein, and Y.J. Liu, Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP, *Nat Immunol, 3*, 673-80, 2002.

Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, and A. Mantovani, Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties, *J Immunol, 161*, 1083-6, 1998.

Sozzani, S., A. Mantovani, and P. Allavena, Control of dendritic cell migration by chemokines, *Forum (Genova), 9*, 325-38, 1999.

Spergel, J.M., Immunology and treatment of atopic dermatitis, *Am J Clin Dermatol, 9*, 233-44, 2008.

Spergel, J.M., E. Mizoguchi, J.P. Brewer, T.R. Martin, A.K. Bhan, and R.S. Geha, Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and

hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice, *J Clin Invest, 101*, 1614-22, 1998.

Spergel, J.M., and A.S. Paller, Atopic dermatitis and the atopic march, *J Allergy Clin Immunol, 112*, S118-27, 2003.

Staquet, M.J., B. Levarlet, C. Dezutter-Dambuyant, and D. Schmitt, Human epidermal Langerhans cells express beta 1 integrins that mediate their adhesion to laminin and fibronectin, *J Invest Dermatol, 99*, 12S-14S, 1992.

Steinman, R.M., The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu Rev Immunol, 9*, 271-96, 1991.

Steinman, R.M., and J. Banchereau, Taking dendritic cells into medicine, *Nature, 449*, 419-26, 2007.

Steinman, R.M., and Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *J Exp Med, 137*, 1142-62, 1973.

Steinman, R.M., and M.C. Nussenzweig, Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance, *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*, 351-8, 2002.

Stumbles, P.A., D.H. Strickland, C.L. Pimm, S.F. Proksch, A.M. Marsh, A.S. McWilliam, A. Bosco, I. Tobagus, J.A. Thomas, S. Napoli, A.E. Proudfoot, T.N. Wells, and P.G. Holt, Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus, *J Immunol, 167*, 228-34, 2001.

Takahara, K., Y. Omatsu, Y. Yashima, Y. Maeda, S. Tanaka, T. Iyoda, B.E. Clausen, K. Matsubara, J. Letterio, R.M. Steinman, Y. Matsuda, and K. Inaba, Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells, *Int Immunol, 14*, 433-44, 2002.

Terada, N., T. Nomura, W.J. Kim, Y. Otsuka, R. Takahashi, H. Kishi, T. Yamashita, N. Sugawara, S. Fukuda, T. Ikeda-Ito, and A. Konno, Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines, *Clin Exp Allergy, 31*, 1923-31, 2001.

Thielen, C., V. Radermacher, M. Trimeche, F. Roufosse, M. Goldman, J. Boniver, and L. de Leval, TARC and IL-5 expression correlates with tissue eosinophilia in peripheral T-cell lymphomas, *Leuk Res, 32*, 1431-8, 2008.

Tsunemi, Y., H. Saeki, K. Nakamura, D. Nagakubo, T. Nakayama, O. Yoshie, S. Kagami, K. Shimazu, T. Kadono, M. Sugaya, M. Komine, K. Matsushima, and K. Tamaki, CCL17 transgenic mice show an enhanced Th2-type response to both allergic and non-allergic stimuli, *Eur J Immunol, 36*, 2116-27, 2006.

Vanbervliet, B., N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, B. Homey, O. de Bouteiller, F. Briere, G. Trinchieri, and C. Caux, The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12, *J Exp Med, 198*, 823-30, 2003.

Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari, and C. Caux, Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces, *Eur J Immunol, 32*, 231-42, 2002.

Vassileva, G., H. Soto, A. Zlotnik, H. Nakano, T. Kakiuchi, J.A. Hedrick, and S.A. Lira, The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes, *J Exp Med, 190*, 1183-8, 1999.

Vecchi, A., L. Massimiliano, S. Ramponi, W. Luini, S. Bernasconi, R. Bonecchi, P. Allavena, M. Parmentier, A. Mantovani, and S. Sozzani, Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells, *J Leukoc Biol, 66*, 489-94, 1999.

Villablanca, E.J., and J.R. Mora, A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN, *Eur J Immunol, 38*, 2975-80, 2008.

von Bubnoff, D., H. Bausinger, H. Matz, S. Koch, G. Hacker, O. Takikawa, T. Bieber, D. Hanau, and H. de la Salle, Human epidermal langerhans cells express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase, *J Invest Dermatol, 123*, 298-304, 2004.

Wang, G., T. Savinko, H. Wolff, M.C. Dieu-Nosjean, L. Kemeny, B. Homey, A.I. Lauerma, and H. Alenius, Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice, *Clin Exp Allergy, 37*, 151-61, 2007.

Wang, L., L.S. Bursch, A. Kissenpfennig, B. Malissen, S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions, *J Immunol, 180*, 4722-7, 2008.

Weihrauch, M.R., O. Manzke, M. Beyer, H. Haverkamp, V. Diehl, H. Bohlen, J. Wolf, and J.L. Schultze, Elevated serum levels of CC thymus and activation-related chemokine (TARC) in primary Hodgkin's disease: potential for a prognostic factor, *Cancer Res, 65*, 5516-9, 2005.

Xiao, T., H. Fujita, H. Saeki, H. Mitsui, M. Sugaya, Y. Tada, T. Kakinuma, H. Torii, K. Nakamura, A. Asahina, and K. Tamaki, Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) produced by mouse epidermal Langerhans cells is upregulated by TNF-alpha and IL-4 and downregulated by IFN-gamma, *Cytokine, 23*, 126-32, 2003.

Yen, J.H., T. Khayrullina, and D. Ganea, PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration, *Blood, 111*, 260-70, 2008.

Yoo, J., M. Omori, D. Gyarmati, B. Zhou, T. Aye, A. Brewer, M.R. Comeau, D.J. Campbell, and S.F. Ziegler, Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin, *J Exp Med, 202*, 541-9, 2005.

Zhang, Z., P. Hener, N. Frossard, S. Kato, D. Metzger, M. Li, and P. Chambon, Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma, *Proc Natl Acad Sci U S A, 106*, 1536-41, 2009.

Zinkernagel, R.M., and P.C. Doherty, MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness, *Adv Immunol, 27*, 51-177, 1979.

Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselin, A. Gordon, T. Pustilnik, D.T. Curiel, P. Galanaud, F. Capron, D. Emilie, and T.J. Curiel, Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells, *Nat Med, 7*, 1339-46, 2001.

6 Zusammenfassung

Die dendritischen Zellen (DC) der Haut, bestehend aus den Langerhans Zellen (LZ) und den dermalen DC (dDC), sind essentiell für die Initiierung von Immunantworten der Haut. Um zu untersuchen, wie sie zu allergischen Immunreaktionen beitragen, ist es entscheidend, die DC Subtypen phänotypisch eindeutig bestimmen und charakterisieren zu können. Bisher waren die Expression von Langerin zusammen mit der Abwesenheit des Oberflächenmoleküls CD103 die einzigen Merkmale, um LZ von dermalen DC und dermalen Langerin+ DC zu unterscheiden. In dieser Arbeit konnte mit CD24a ein weiteres Epitop gefunden werden, welches zwischen Langerin+ Zellen und dDC innerhalb der Haut und im Haut-drainierenden Lymphknoten differentiell exprimiert wird.

CCL17 ist ein inflammatorisches Chemokin, welches von reifen CD11c+ CD8α- CD11b+ DEC205+ DC nach *„toll-like-receptor“* (TLR) Stimulierung oder nach Aktivierung durch TSLP, IL-4, PGE2 oder TNF sezerniert wird. CCL17+ DC sind in den peripheren Lymphknoten, der Mukosa von Lunge und Darm, jedoch nicht in normaler Haut und der Milz zu finden. CCL17 adressiert, wie CCL22 auch, den Rezeptor CCR4. CCR4 ist auf aktivierten Th2-Zellen, regulatorischen T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen, aber auch auf LZ zu finden. Während einer Entzündungsreaktion wurde CCL17 bisher die Funktion der Rekrutierung von aktivierten T-Zellen an den Ort der CCL17 Sezernierung zugesprochen. Weiterhin wurde die Expression von CCL17 mit atopischen Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Bei der atopischen Dermatits (AD) korreliert die Stärke der CCL17 Expression innerhalb der Haut und im Serum eng mit dem Schweregrad dieser Hauterkrankung. Mit der Verwendung von CCL17/EGFP Reportermäusen gelang es in dieser Arbeit zu zeigen, dass im Gegensatz zu normaler Haut, die Exposition der Haut mit einem Antigen zu einer CCL17 Expression auf den meisten dDC und einem Teil der LZ, allerdings nicht auf Keratinozyten führt. Desweitern wurde ein Mausmodell für AD verwendet, um den Einfluss von CCL17 auf die Pathogenese dieser Krankheit zu untersuchen. In Abwesenheit von CCL17 waren die leukozytäre Infiltration der Dermis, die Allergen-spezifische humorale Immunantwort, sowie die Generierung von Effektor-T-Zellen deutlich reduziert. Als Ursache dafür konnte eine weitere, bisher unbekannte Funktion von CCL17 nachgewiesen werden. Es konnte innerhalb dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass CCL17 im Rahmen einer Entzündung wichtig für die Auswanderung der DC aus dem peripheren Gewebe ist. Mit Hilfe von *in vitro* Migrationstests konnte bei der CCR7/CCR7Ligand vermittelten Wanderung eine deutlich effizientere Migration in Anwesenheit von CCL17 gezeigt werden, da sich die Geschwindigkeit der DC-Wanderung erhöhte und die Direktionalität verbessert wurde. CCL17 ist demnach ein entzündliches Chemokin, welches bei allergischen Immunreaktionen die CCR7 vermittelte Wanderung von DC aus der Haut fördert.

7 Summary

Professional antigen presenting cells of the skin, namely Langerhans cells (LC) and dermal dendritic cells (dDC) are crucial for mediating skin immune reactions. For further understanding of their contribution to allergic skin reactions, the phenotypic characterization and identification of DC subpopulations is essential. Until now the expression of Langerin and the absence of the surface molecule CD103 were the only distinctive markers, by which LC can be distinguished from dermal Langerin+ cells and conventional dDC. Within this thesis it is shown that the heat stable antigen CD24a is differentially expressed on Langerin+ cells and dDC in the skin and skin draining lymph nodes and can be used as a convenient surface marker to distinguish between different cutaneous DC subsets.

CCL17 is an inflammatory chemokine, which is expressed by CD11c+ CD8α- CD11b+ DEC205+ DC after activation through toll-like-receptor (TLR) stimulation or through TSLP, IL-4, PGE2 or TNF□. CCL17+ DC are located within peripheral lymph nodes as well as the mucosa of lung and gut, but are completely absent from untreated skin and the spleen. CCL17 and CCL22 share the receptor CCR4 that is mainly found on activated Th2 cells, regulatory T cells, memory T cells and on LC. During an inflammatory response, CCL17 was previously shown to recruit activated T cells to the site of chemokine secretion. Additionally, the expression of CCL17 has been associated with atopic diseases. In patients suffering from Atopic Dermatitis (AD) the level of CCL17 in the circulation correlates with the severity of the disease. Using CCL17/EGFP reporter mice, it could be shown that in contrast to normal skin, allergen exposure leads to CCL17 expression by most of the dDC and to a lesser extend LC, but not keratinocytes within the epidermis.

To analyze the precise role of CCL17 in the pathogenesis of AD, a mouse model of AD was utilized to compare CCL17-deficient mice with wild-type mice regarding their development of AD symptoms. The absence of CCL17 led to decreased dermal infiltration and allergen-specific humoral immune responses, in line with lower numbers of effector T cells. In addition, a so far unknown function of CCL17 was identified in this thesis: CCL17 is essential to mediate the emigration of skin-derived DC in an inflammatory micromilieu. By using in vitro migration assays it was possible to show that the CCR7/CCR7Ligand mediated migration is strongly enhanced in the presence of CCL17. This is also indicated by a significant increase of migratory velocity and directionality of the cells in the presence of CCL17.

In conclusion, CCL17 plays an essential role in allergic skin diseases by promoting the CCR7-dependent emigration of DC from the skin under inflammatory conditions.

8 Danksagung

Zum Schluss möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen zu bedanken, die mir bei meiner Promotion zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Irmgard Förster für die Überlassung des spannenden Themas. Außerdem würde ich ihr gerne für das unendliche Vertrauen und die kontinuierliche Unterstützung bei gleichzeitiger Gewährung eines großen Freiraums danken. Sie hat mich außerordentlich gefördert und ich konnte nicht nur wissenschaftlich viel von ihr lernen.

Bei Herrn Prof. Klaus Pfeffer möchte ich mich für die langjährige finanzielle Unterstützung und die freundliche Integration in seinem Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene bedanken.

Herrn Prof. Hans Hegemann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Außerdem würde ich mich gerne bei Prof. Waldemar Kolanus bedanken, da er es mir ermöglichte, essentielle Studien in seinem Labor durchzuführen.

Besonderer Dank gilt auch Bettina Jux, für die vielen konstruktiven Gespräche und die wundervolle Zusammenarbeit. Wir waren ein tolles Team.

Auch meinen lieben Kollegen möchte ich für die wunderschöne Zeit danken. Wir hatten viel Spass und viel zu lachen. Außerdem wart ihr sehr geduldig mit mir als junge und manchmal übernächtigte Mutter.
Besonders bedanken möchte ich mich bei Nancy Gerbitzki für die Hilfe bei den Migrationsmessungen. Meike Winter danke ich für so manchen Rat in jeder Lebenslage. Thesesa Globisch danke ich für unsere „CCL17-Diskussionen“. Bei Ingo Uthe und Markus Korkowski bedanke ich mich für die ausgezeichnete technische Unterstützung.
Auch Heike Weighardt möchte ich fürs Zuhören, die vielen guten und lieben Ratschläge, sowie für so manchen Tipp danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meiner Familie.
Besonders mein Mann Andreas Stutte hat mit seiner unendlichen Geduld und liebevollen Unterstützung zum Erfolg dieser Promotionsarbeit beigetragen.

9 Anhang

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden teilweise veröffentlicht:

CD24a expression levels discriminate Langerhans cells from dermal dendritic cells in murine skin and lymph nodes.

Stutte S, Jux B, Esser C, Förster I.

J Invest Dermatol. 2008 Jun;128(6):1470-5. Epub 2008 Jan 10.

Hiermit erkläre ich, dass die hier vorliegende Promotionsarbeit mit dem Titel: „Funktion des Chemokins CCL17 bei allergischen Immunreaktionen der Haut“ von mir selbständig verfasst und neben den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 14. Mai 2009