



Regulation und funktionelle Relevanz  
des Chemokins CCL17 in der Milz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Theresa Globisch

aus Dortmund

Düsseldorf, April 2012

Aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juni 2012

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>III.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1.	Das Immunsystem .....	9
1.2.	Lymphatische Organe .....	10
1.2.1.	<i>Lymphknoten</i> .....	11
1.2.2.	<i>Aufbau und Funktion der Milz</i> .....	12
1.3.	Dendritische Zellen .....	15
1.3.1.	<i>Die Entwicklung von DC</i> .....	16
1.3.2.	<i>Subgruppen von DC</i> .....	18
1.4.	Chemokine und Chemokinrezeptoren .....	19
1.4.1.	<i>Das Chemokin CCL17</i> .....	20
1.4.2.	<i>Wirkung von CCL17</i> .....	22
1.4.3.	<i>Verwandtschaft mit CCL22</i> .....	24
1.5.	miRNA .....	24
1.6.	Zielsetzung der Arbeit .....	26
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1.	Material .....	27
2.1.1.	<i>Geräte</i> .....	27
2.1.2.	<i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	27
2.1.3.	<i>Enzyme</i> .....	29
2.1.4.	<i>Lösungen und Puffer</i> .....	29
2.1.5.	<i>Antikörper für die Durchflusszytometrie</i> .....	31
2.1.6.	<i>Primärantikörper für die Histologie</i> .....	31
2.1.7.	<i>Sekundärantikörper für die Histologie</i> .....	32
2.1.8.	<i>Antikörper für ELISA</i> .....	32
2.1.9.	<i>Standards für ELISA</i> .....	32
2.1.10.	<i>Neutralisierende Antikörper für die in vivo-Injektion</i> .....	33
2.1.11.	<i>Zytokine</i> .....	33
2.1.12.	<i>Medium</i> .....	33
2.1.13.	<i>Sonstige Verbrauchsmaterialien</i> .....	33
2.1.14.	<i>Verwendete Software</i> .....	34
2.1.15.	<i>Verwendete Online-Datenbanken</i> .....	35
2.1.16.	<i>Versuchstiere</i> .....	35

2.2.	Methoden.....	36
2.2.1.	Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung mit Trypanblau .....	36
2.2.2.	Isolierung von Zellen aus lymphatischen Organen .....	36
2.2.3.	Erythrozytenlyse .....	37
2.2.4.	Anreicherung von DC durch MACS.....	37
2.2.5.	Kultivierung und Stimulation von ex vivo-DC.....	37
2.2.6.	Durchflusszytometrie.....	38
2.2.7.	Zell-Sort .....	39
2.2.8.	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	39
2.2.9.	Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten .....	40
2.2.10.	ELISA.....	40
2.2.11.	Intraperitoneale Injektion von LPS.....	42
2.2.12.	Intraperitoneale Injektion von 3-Methylcholanthren .....	42
2.2.13.	Intraperitoneale Injektion von GalCer .....	43
2.2.14.	Immunisierung mit OVA .....	43
2.2.15.	Immunisierung mit Pneumokokken-Polysaccharid .....	44
2.2.16.	Blutentnahme.....	44
2.2.17.	CASP-OP.....	45
2.2.18.	In vivo-Zytotoxizitäts-Assay .....	46
2.2.19.	Statistik.....	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1.	Unterschiedliche Genexpressionsmuster in DC der LK und der Milz.....	47
3.1.1.	Über 850 differentiell exprimierte Gene unterscheiden CCL17+ LK- und CCL17-Milz-DC .....	47
3.1.2.	Milz-DC und LK-DC unterscheiden sich in ihrem Chemokin-Profil .....	52
3.1.3.	Erhöhte Anreicherung IFN- $\gamma$ -assoziierter Gene in Milz-DC .....	53
3.1.4.	LK-DC regulieren den IFN $\gamma$ R herunter.....	55
3.1.5.	Differentielle Expression von CCL22 zwischen LK- und Milz-DC.....	56
3.1.6.	Analyse der Korrelation der CCL17- und AhRR-Expression in der Milz.....	57
3.1.7.	Alternierende Expression von 17 miRNA zwischen DC der LK und der Milz .....	58
3.2.	Regulation von CCL17 in Milz-DC.....	60
3.2.1.	Suppression von CCL17 zeigt keine Abhängigkeit vom LT $\beta$ R.....	60
3.2.2.	IFN $\gamma$ R-defiziente Mäuse können CCL17 nach LPS-Stimulation in der Milz induzieren .....	61
3.2.3.	Milz-DC reagieren auf IL-4 und GM-CSF mit CCL17-Produktion .....	62
3.2.4.	$\alpha$ -Galactosylceramid induziert CCL17 in vivo .....	64
3.2.5.	Charakterisierung CCL17-produzierender Milz-DC .....	71
3.2.6.	Splenozyten zeigen eine verstärkte Zytokinsekretion durch Vorbehandlung mit GalCer .....	74

---

3.2.7. Die Neutralisierung von IL-4 und GM-CSF kann der Produktion von CCL17 entgegenwirken.....	76
3.3. Einfluss von CCL17 auf die humorale Immunabwehr .....	80
3.3.1. Basale Immunglobulinspiegel .....	80
3.3.2. T-Helfer-abhängige humorale Immunantwort .....	81
3.3.3. T-Helfer-unabhängige humorale Immunantwort.....	85
3.4. Die Rolle von CCL17 bei der zellvermittelten Abwehr .....	88
3.5. CCL17 im Sepsismodell .....	91
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>96</b>
4.1. Vergleichende Analyse der Mikroarrays von Milz- und LK-DC .....	96
4.2. Untersuchung der Regulation von CCL17 in Milz-DC.....	99
4.3. Die physiologische Rolle der CCL17-Suppression in der Milz .....	102
4.3.1. Analyse der Daten aus dem Sepsismodell .....	103
4.3.2. Ergebnisse des In vivo-Zytotoxizitäts-Assays und Gegenüberstellung mit Literaturdaten .....	105
4.3.3. Die Rolle von CCL17 in der humoralen Immunantwort.....	107
4.4. Ausblick .....	108
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>111</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>132</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>133</b>
9.1. Daten der mRNA-Expressionsanalyse .....	133
9.2. miRNA-Array-Daten.....	149
9.3. Eidesstattliche Erklärung .....	150

## I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	Ammoniumchlorid-Tris
AD	Atopische Dermatitis
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CASP	Colon ascendens stent peritonitis
CD	Cluster of differentiation
CDP	gemeinsamer DC-Vorläufer ( <i>common DC progenitor</i> )
CLP	gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle ( <i>common lymphoid progenitor</i> )
CMP	gemeinsame myeloide Vorläuferzelle ( <i>common myeloid progenitor</i> )
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
GalCer	$\alpha$ -Galactosylceramid
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HEV	<i>high endothelial venule</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IFN $\gamma$ R	Interferon-gamma-Rezeptor
IKDC	Interferon-produzierende Killer-DC
IL	Interleukin
iT <sub>reg</sub>	induzierbare ( <i>inducible</i> ) T <sub>reg</sub>
JAK	Janus-Kinase
LC	Langerhans-Zelle
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid

---

MACS	Magnetic-activated cell sorting
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe ( <i>mucosa-associated lymphatic tissue</i> )
MDP	gemeinsamen Vorläuferzelle für Monozyten, Makrophagen und DC ( <i>macrophage-DC progenitor</i> )
MFI	Median Fluorescence Intensity
miRNA	micro-RNA
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MHC I	MHC-Molekül der Klasse I
MHC II	MHC-Molekül der Klasse II
MZ	Marginalzone
nT <sub>reg</sub>	natürliche ( <i>natural</i> ) T <sub>reg</sub>
OVA	Ovalbumin
PALS	periarterielle Lymphozytenscheiden ( <i>periarteriolar lymphoid sheath</i> )
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster ( <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein Complex
PP	Peyer'sche Plaques ( <i>Peyer's Patches</i> )
PPS	Pneumococcal Polysaccharide
PRR	Mustererkennungs-Rezeptoren ( <i>pattern-recognition receptors</i> )
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SPF	spezifiziert pathogenfrei ( <i>specific pathogen-free</i> )
TARC	thymus- and activation-regulated chemokine, CCL17
Tab.	Tabelle
TI	Thymus-unabhängig ( <i>thymus-independent</i> )
TLR	Toll-like receptor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle

## II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der lymphatischen Gewebe im Körper .....	10
Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Lymphknotens .....	12
Abb. 3: Anatomie der Milz.....	13
Abb. 4: Mikroarchitektur der Milz.....	14
Abb. 5: Schematische Darstellung der Entwicklung dendritischer Zellen .....	17
Abb. 6: Vereinheitlichendes Modell muriner DC-Subgruppen .....	18
Abb. 7: Überblick über Chemokine und dazugehörige -rezeptoren.....	20
Abb. 8: Schematische Darstellung zur Entstehung und Funktion von miRNA.....	25
Abb. 9: Schematische Darstellung der CASP-Methode .....	45
Abb. 10: Zellsort-Strategie zur Isolierung CCL17-negativer Milz- bzw. CCL17-positiver LK-DC .....	48
Abb. 11: Beurteilung der RNA-Probenqualität anhand von Scatterplots .....	48
Abb. 12: Principle Component Analysis der Datensätze .....	49
Abb. 13: Vergleich der Anzahl differentiell exprimierter Gene .....	49
Abb. 14: Ergebnisse der DAVID-Analyse.....	51
Abb. 15: Resultate der FunNet-Analyse .....	52
Abb. 16: Auflistung aller differentiell exprimierten IFN- $\gamma$ -assoziierten Gene .....	54
Abb. 17: Vergleich der Expression des Rezeptors für IFN- $\gamma$ zwischen Milz- und LK-DC.....	56
Abb. 18: Vergleich der CCL17- und CCL22-Produktion zwischen Milz- und LK-DC .....	57
Abb. 19: Keine Korrelation zwischen der CCL17- und AhRR-Expression in der Milz .....	58
Abb. 20: Untersuchung der CCL17-Produktion von LT $\beta$ R-defizienten DC .....	61
Abb. 21: IFN $\gamma$ R-defiziente Mäusen zeigen eine erhöhte CCL17-Produktion in der Milz nach LPS .....	62
Abb. 22: Zytokin-induzierte CCL17-Produktion in Milz.....	64
Abb. 23: Untersuchung der Auswirkungen von GalCer (I).....	66
Abb. 24: Untersuchung der Auswirkungen von GalCer (II).....	66
Abb. 25: GalCer verstärkt den prozentualen Anteil CCL17-produzierender DC in der Milz .....	67
Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EGFP-Expression in der Milz .....	68
Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EGFP-Expression in LK .....	69
Abb. 28: Median Fluorescence Intensity EGFP-exprimierender DC nach GalCer-Behandlung.....	70
Abb. 29: CCL17- und CCL22-Proteinproduktion durch Milz-DC nach GalCer.....	70
Abb. 30: Charakterisierung CCL17-produzierender Milz-DC (I) .....	71
Abb. 31: Charakterisierung CCL17-produzierender Milz-DC (II) .....	73
Abb. 32: Zytokinproduktion von Splenozyten nach einmaliger Gabe von GalCer.....	75
Abb. 33: Abhängigkeit des Anteils CCL17-produzierender DC von der GalCer-Dosis.....	76

---

Abb. 34: Neutralisierende Antikörper gegen IL-4 und GM-CSF wirken der CCL17-Produktion in der Milz entgegen (I) .....	77
Abb. 35: Keine Inhibierung der CCL17-Produktion in den LK .....	77
Abb. 36: Neutralisierende Antikörper gegen IL-4 und GM-CSF wirken der CCL17-Produktion in der Milz entgegen (II) .....	78
Abb. 37: GM-CSF-defiziente Mäuse zeigen keine CCL17-Produktion nach GalCer.....	79
Abb. 38: Basale Gesamt-Immunglobulinspiegel von CCL17E/E-Balb/c-Mäusen und WT-Kontrollen.....	81
Abb. 39: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (I) .....	82
Abb. 40: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (II) .....	83
Abb. 41: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (III).....	84
Abb. 42: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (IV) .....	84
Abb. 43: Untersuchung der T-Helfer-unabhängigen humoralen Immunantwort (I) .....	86
Abb. 44: Untersuchung der T-Helfer-unabhängigen humoralen Immunantwort (II) .....	87
Abb. 45: Untersuchung der T-Helfer-unabhängigen humoralen Immunantwort (III) .....	87
Abb. 46: Ergebnisse der In vivo-Zytotoxizitäts-Assays .....	89
Abb. 47: Einfluss der CASP-OP auf die CCL17/EGFP-Expression von Milz-DC .....	92
Abb. 48: Relevanz von CCL17 für das Überleben nach CASP-OP (I).....	92
Abb. 49: Relevanz von CCL17 für das Überleben nach CASP-OP (II).....	94
Abb. 50: Analyse von CCL17-DTR-Mäusen mittels CASP-Modell.....	95
Abb. 51: Abhängigkeit der CTL-Antwort von CCL17 .....	105
Abb. 52: Abhängigkeit der CTL-Antwort vom Adjuvans .....	106

### III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der am stärksten differentiell regulierten Gene .....	50
Tab. 2: Liste aller differentiell exprimierten Chemokine und Chemokin-Rezeptoren .....	53
Tab. 3: Auflistung aller gefundenen, differentiell zwischen LK- und Milz-DC exprimierten miRNAs..	59
Tab. 4: Liste aller differentiell exprimierten Gene .....	133
Tab. 5: Gegenüberstellung differentiell transkribierten miRNA und mRNA.....	149

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist ständig einer Vielzahl von Bedrohungen ausgesetzt; pathogene Bakterien, Viren und Pilze müssen abgewehrt, und dabei von harmlosen Kommensalen unterschieden werden, und entartete Körperzellen müssen eliminiert werden, ohne jedoch gesunde körpereigene Strukturen zu beschädigen. Diese Vielzahl von Aufgaben wird durch das Immunsystem bewältigt, welches sich bei höheren Vertebraten in zwei funktionelle Arme, das angeborene und das erworbene (adaptive) System, gliedert.

Bei dem angeborenen Teil des Immunsystems handelt es sich um phylogenetisch konservierte Strategien, mit denen ein Großteil von Pathogenen bereits wirksam bekämpft werden kann, bevor es zu einer Infektion kommt. Physiologische Barrieren wie Haut und Schleimhäute schützen mechanisch vor eindringenden Mikroorganismen, während antibakterielle Peptide und niedriger pH-Wert auf chemischem Weg die Besiedlung erschweren. Das Komplementsystem tritt in der Blutbahn mit eingedrungenen Pathogenen in Kontakt und unterstützt direkt und indirekt ihre Zerstörung. Den wichtigsten Bestandteil der unspezifischen Immunität stellen jedoch phagozytisch aktive Immunzellen wie z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen (DC) dar, die Pathogene auf Basis charakteristischer, konservierter Strukturen, so genannter PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) erkennen. Zu ihren Aufgaben gehört nicht nur eine schnelle Abtötung eingedrungener Erreger, sondern gegebenenfalls auch die Induktion einer spezifischen Immunantwort mittels Antigenpräsentation an Lymphozyten.

Die Ausbildung einer solchen auch als adaptiven Immunität bezeichneten Antwort beruht auf der Erkennung erregerspezifischer Fragmente durch einzelne Lymphozyten, deren Arsenal an Rezeptoren durch somatische Rekombination entstanden ist und somit eine enorme Variabilität besitzt.

Hierbei ist zwischen B- und T-Lymphozyten zu unterscheiden, denen jeweils andere Aufgaben unterliegen: B-Lymphozyten sind die tragende Komponente der humoralen Abwehr; ihre Hauptfunktion besteht in der Sekretion hochspezifischer Antikörper, die wirksam Toxine neutralisieren sowie Pathogene für die Elimination durch Fresszellen opsonisieren können. T-Lymphozyten, die wichtigsten Faktoren der zellvermittelten Immunität, nehmen je nach Subpopulation verschiedene Aufgaben wahr; beispielsweise erkennen zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) infizierte Zellen und töten sie ab. Dagegen können T-Helferzellen ( $T_H$ ) Immunreaktionen koordinieren, andererseits wiederum regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) supprimierend wirken.

Charakteristisch für eine adaptive Immunantwort ist eine klonale Expansion von aktivierten Lymphozyten, sowie die Ausbildung von spezifischen Gedächtniszellen, die jahrelang überdauern und bei erneutem Erregerkontakt eine Bekämpfung der Erkrankung beschleunigen oder sogar ihren Ausbruch verhindern können.

Die adaptive Immunität benötigt für ihre Entwicklung jedoch meist einige Tage, so dass im Falle einer Infektion deren Bekämpfung anfänglich allein dem angeborenen Teil obliegt.

## 1.2. Lymphatische Organe

Durch seine strukturelle Beschaffenheit sorgt das Immunsystem für eine flächendeckende Überwachung des gesamten Körpers, damit eindringende Pathogene schnell entdeckt und effizient beseitigt werden können. So beherbergen periphere Gewebe, die in der Nähe möglicher Eintrittsstellen von Pathogenen liegen, Makrophagen und DC, die eingedrungene Keime nach Möglichkeit schnell erkennen und phagozytieren. Zusätzlich gewährleistet die Ausbildung spezialisierter Organe eine effiziente Weitergabe von Informationen.

Nach ihrer Funktion unterscheidet man die primären lymphatischen Organe, die an der Neubildung von Immunzellen beteiligt sind, von den sekundären lymphatischen Organen, die im Wesentlichen eine Rolle in der Einleitung adaptiver Immunreaktionen spielen.

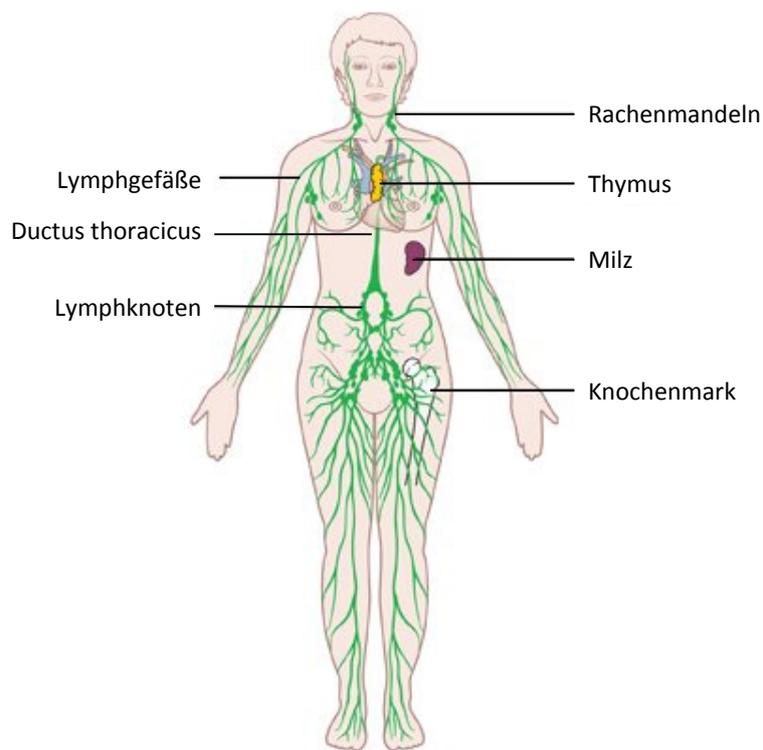


Abbildung 1: Schematische Darstellung der lymphatischen Gewebe im Körper (Quelle: CancerHelp UK).

Zu den primären Organen des Immunsystems zählt einerseits das Knochenmark, andererseits der Thymus. Im Knochenmark, dem Hauptort der Hämatopoese, reifen unter anderem B-Zellen heran; aber auch die Vorläufer der T-Lymphozyten werden hier gebildet, bevor sie in den Thymus einwandern und dort einen mehrstufigen Reifungs- und Selektionsprozess durchlaufen.

Nach der Reifung verlassen die naiven Lymphozyten ihren jeweiligen Bildungsort und patrouillieren kontinuierlich durch das Blut, bis sie auf sekundäre lymphatische Organe treffen. Hierzu zählen die Lymphknoten (LK), die im gesamten Körper anzutreffen sind, die Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (*mucosa-associated lymphatic tissue*, MALT) sowie die Milz. In diesen Organen treffen die Lymphozyten mit eingewanderten antigenpräsentierenden Zellen (APC) zusammen. Diese tragen Antigene aus peripheren Infektionsherden mit sich und können Lymphozyten mit passenden Rezeptoren dazu aktivieren, zu proliferieren und zu entsprechenden Effektorzellen auszudifferenzieren.

Findet ein geeigneter Kontakt jedoch nicht statt, verlassen die naiven Lymphozyten die jeweiligen sekundären lymphatischen Organe wieder, und zirkulieren weiter zwischen Blut und Lymphe.

### 1.2.1. Lymphknoten

LK finden sich an vielen Stellen entlang lymphatischer Gefäße, die den Körper von der Peripherie in Richtung *Ductus thoracicus* durchziehen. Indem sie die Lymphe und somit die extrazelluläre Flüssigkeit der umliegenden Gewebe drainieren, überwachen sie den Körper im Hinblick auf Infektionen.

In den LK sind zahlreiche Lymphozyten räumlich getrennt in den B-Zell-Follikeln oder parakortikalen T-Zell-Zonen beheimatet, ebenso wie APC.

Über afferente lymphatische Gefäße werden Antigene mit dem Lymphfluss direkt in den LK transportiert und hier festgehalten. Bei diesem Prozess spielen vor allem folliculäre DC eine Rolle, die zirkulierende Immunkomplexe von antigenem Material mit Hilfe ihrer Fortsätze festhalten können (Usui et al., 2012). Zusätzlich erreichen geweberesidente APC, die bereits in der Peripherie Kontakt mit antigenen Bestandteilen hatten, über den afferenten Lymphfluss den LK (Andrian and Mempel, 2003).

Naive Lymphozyten dagegen wandern mit dem Blutfluss über Venolen (*high endothelial venules*, HEV) in die LK ein. Diese verlaufen meist im parakortikalen Bereich, und erleichtern den Austritt der Zellen an dieser Stelle durch spezielle Rezeptoren und die Produktion von Chemokinen (Miyasaka and Tanaka, 2004).

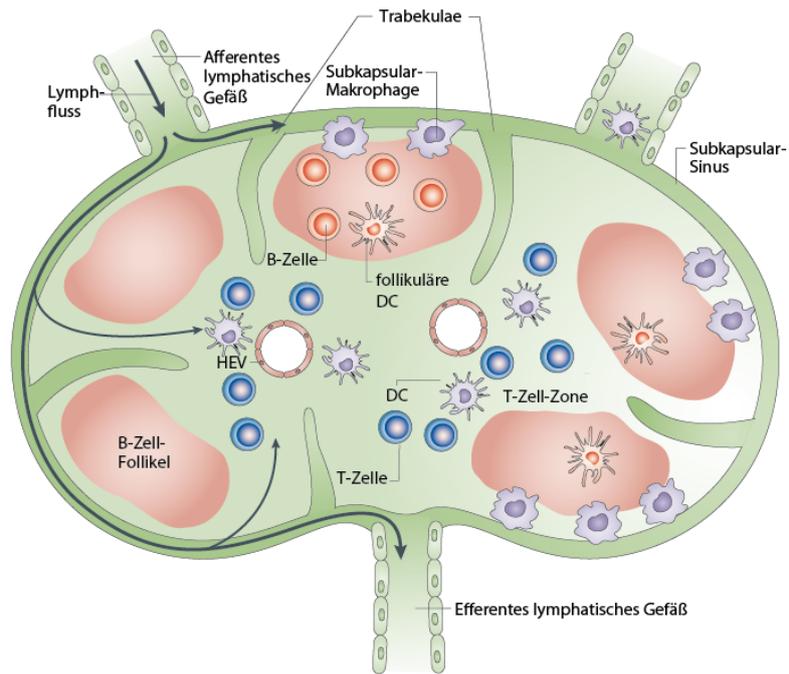


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Lymphknotens. Modifiziert nach Swartz and Lund, 2012.

Gleichzeitig verlassen immer wieder nicht aktivierte naive Lymphozyten sowie ausdifferenzierte Effektorzellen den LK über efferente Gefäße in die Lymphe, so dass im gesunden System ein stetiges Gleichgewicht herrscht .

### 1.2.2. Aufbau und Funktion der Milz

Das größte sekundäre lymphatische Organ des Körpers, die Milz, stellt hinsichtlich seiner Struktur und der in ihr beheimateten Zellpopulationen ein sehr komplexes Gebilde dar, das nicht nur immunologische, sondern auch hämatologische Funktionen besitzt.

Anatomisch gesehen befindet sich die Milz im linksseitigen Oberbauch unterhalb des Zwerchfells und in direkter Nachbarschaft zum Magen. Umgeben von einer Bindegewebskapsel, gliedert sich die Milz in drei Haupt-Kompartimente: die rote Pulpa, die weiße Pulpa und die Marginalzone, die auch manchmal der weißen Pulpa hinzugerechnet wird.

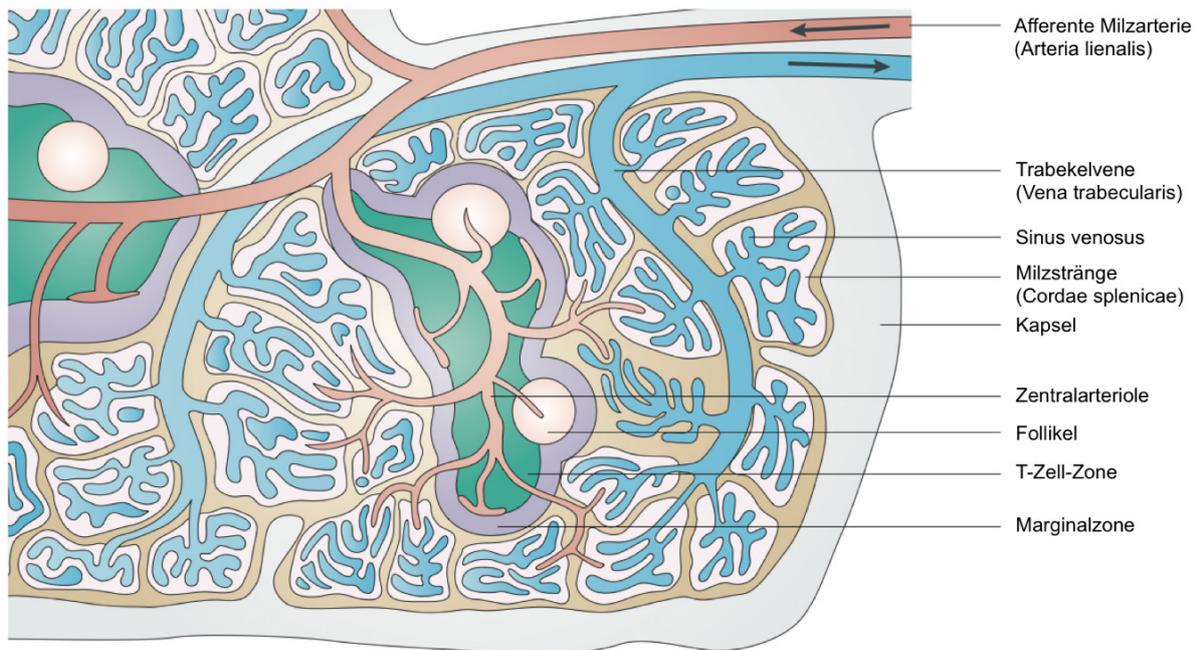
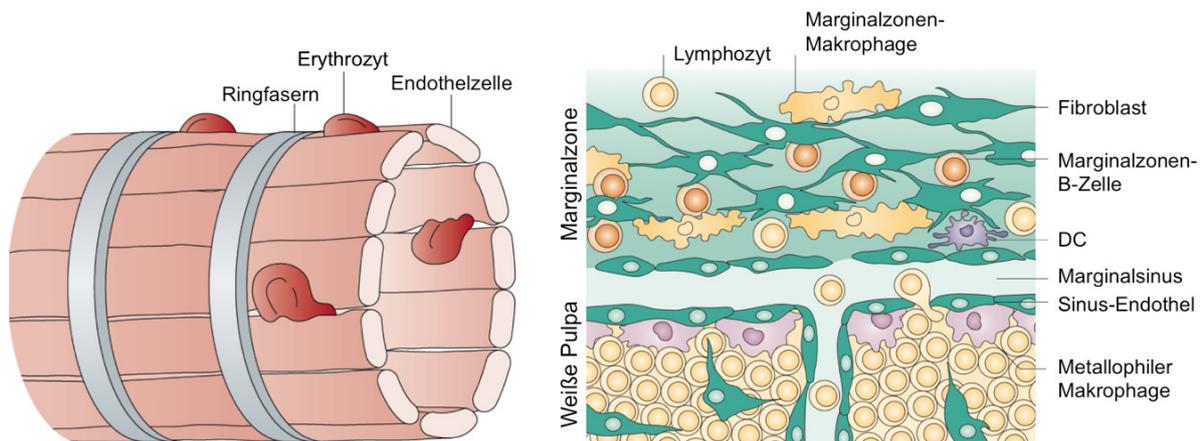


Abbildung 3: Anatomie der Milz. Modifiziert nach Mebius and Kraal, 2005.

Über die *Arteria lienalis* wird die Milz mit Blut versorgt; diese verzweigt sich innerhalb des Organs in Zentralarterien, die sich in ein weites Netz von Arteriolen und Kapillaren aufspalten, und die schließlich die Sinus der roten Pulpa bilden, bevor sie sich wieder zur *Vena lienalis* vereinen. Im Gegensatz zu den LK besitzt die Milz keine afferenten Lymphgefäße und überwacht somit ausschließlich den Blutfluss. Dagegen besitzt sie jedoch scheinbar, ebenso wie die LK, efferente lymphatische Gefäße, die einen Austritt der Zellen in die Lymphe ermöglichen (Pellas and Weiss, 1990). Dieser Mechanismus spielt jedoch eher eine untergeordnete Rolle bei der Zirkulation von Lymphozyten.

Die Aufgabe der roten Pulpa liegt in der Beseitigung alter oder beschädigter Blutzellen wie Erythrozyten, Thrombozyten und apoptotischer Zellen. Diese verfügen nicht mehr über die nötige Flexibilität, sich durch das von Stressfasern durchzogene venöse Gefäßgeflecht zu bewegen und werden zurückgehalten. Hierbei kommt Makrophagen die Aufgabe zu, Eisen aus Hämoglobin freizusetzen und zu recyceln.



**Abbildung 4: Mikroarchitektur der Milz.** Links: Schema eines venösen Sinus in der roten Pulpa. Durch Kontraktur der ringförmigen Stressfasern wird der Blutfluss durch Spalte zwischen den Endothelzellen reguliert und alte Erythrozyten nachlassender Flexibilität zurückgehalten. Rechts: schematische Darstellung der Marginalzone. Wichtigste Populationen residenter Zellen sind Marginalzonen-B-Zellen und -Makrophagen; dazu kommen zahlreiche weitere Zelltypen, die die Marginalzone mit dem Blutfluss in Richtung roter Pulpa durchlaufen. Modifiziert nach Mebius and Kraal, 2005.

In der Maus bildet die rote Pulpa vor allem in subkapsulären Regionen zudem ein Reservoir für Monozyten, die in einem experimentellen Modell für Myokard-Infarkt in großen Mengen mobilisiert werden konnten (Swirski et al., 2009).

Die weiße Pulpa untergliedert sich weiterhin in T-Zell-reiche Zonen, die auch als periarterielle Lymphozytenscheiden oder PALS (*periarteriolar lymphoid sheath*) bezeichnet werden und die Pulpaarterien nahtlos umschließen, sowie in die B-Zell-Follikel. Sie ähnelt damit strukturell in ihrem Aufbau den Lymphknoten. Hier werden jedoch vorrangig Immunantworten gegen Pathogene eingeleitet, die in die Blutbahn gelangt sind und vor Ort von APC phagozytiert worden sind. Somit kann die Milz auch als ein Blutfilter für Pathogene gesehen werden.

Die Marginalzone (MZ) stellt einerseits eine stark frequentierte Durchgangszone für aus dem Blut in die weiße Pulpa einwandernde Zelle dar; sie enthält andererseits aber auch mehrere einzigartige Populationen von Zellen, wie zum Beispiel MZ-B-Zellen sowie MZ-Makrophagen, die für die Funktion der Milz eine große Rolle spielen.

MZ-B-Zellen scheinen funktionell den B1-Zellen der Pleural- und Peritonealhöhle nahe zu stehen. Sie weisen eingeschränktere Rezeptorspezifitäten als konventionelle (B2-) B-Zellen auf, generieren schneller Plasmazellen (Oliver et al., 1999), und sind ebenfalls an der Immunantwort auf T-Zell-unabhängige Antigene beteiligt (Martin et al., 2001; Balázs et al., 2002). Die MZ-Makrophagen auf der anderen Seite scheinen für das Einfangen partikulärer bakterieller Antigene aus der Blutbahn von besonderer Bedeutung zu sein (Buiting et al., 1996; Aichele et al., 2003).

In den ersten Entwicklungsmonaten ist die Milz zusätzlich an der Blutbildung beteiligt; später wird diese Aufgabe aber ausschließlich vom Knochenmark übernommen und höchstens im Kontext verschiedener Krankheiten wiedererlangt (Dewan et al., 2010; Jackson et al., 2010). In der Maus residieren während der gesamten Lebensdauer hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC) in der Milz, die in Knochenmark-ablatierten Tieren blutbildende Funktionen übernehmen können (Morita et al., 2011).

Trotz ihrer zahlreichen und komplexen Aufgaben handelt es sich bei der Milz jedoch nicht um ein Organ von lebenswichtiger Bedeutung, und aktuellen Zahlen zufolge lebt rund 1% der Deutschen infolge von Fehlanlagen oder operativer Splenektomie ohne Milz (Deutsche Gesellschaft für Infektiologie). Asplenie geht jedoch mit einem vergrößerten Risiko für Infektionen mit v.a. bekapselten bakteriellen Erregern und einer stark erhöhten Mortalität infolge von Sepsis einher (Ejstrud et al., 2000; Hansen and Singer, 2001; Beytout et al., 2003).

### 1.3. Dendritische Zellen

Die von Ralph Steinman 1972 entdeckten DC gehören in die Gruppe der professionellen APC und nehmen somit eine besondere Stellung an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität ein (Steinman and Cohn, 1973). Die Namensgebung bezieht sich dabei auf die langen Fortsätze, die den Dendriten von Nervenzellen ähneln. Da der Anteil der DC in lymphoiden wie nicht-lymphoiden Organen nur sehr gering ist, wurde die Population lange Zeit in ihrer Bedeutung unterschätzt und kontrovers diskutiert.

Ausserhalb lymphatischer Gewebe patrouillieren oder residieren unreife DC auf der Suche nach Antigenen, die sie durch Phagozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Makropinozytose aufnehmen. In diesem Zustand sind sie mit einem großen Repertoire an Rezeptoren für PAMPs sowie für Entzündungsbestandteile ausgestattet, darunter TLRs, NOD-Proteine, RIG-I-like Rezeptoren und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (Bates et al., 1999; Kato et al., 2005; Ueno et al., 2007; Huysamen et al., 2008).

Bei Aktivierung migrieren die DC in die LK, wobei es zu einer Ausreifung und damit verbundenen Modifikationen des Phänotyps kommt; während sich die Fähigkeit zur Phagozytose verliert, werden MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*; Haupthistokompatibilitätskomplex) sowie costimulatorische Moleküle nun verstärkt exprimiert. Wie alle professionellen APC sind DC in der Lage, T-Zellen Antigene nicht nur über MHC-Moleküle der Klasse I (MHC I), sondern auch über die der Klasse II (MHC II) zu präsentieren. Somit erreichen sie nicht nur CD8<sup>+</sup> CTL, sondern auch CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen. Eine Besonderheit gegenüber anderen APC stellt hierbei die Tatsache dar, dass einige

Subgruppen von DC auch extrazelluläre Antigene sehr effizient über MHC I an CD8<sup>+</sup> CTL präsentieren können, ein Vorgang, der als Kreuz-Präsentation (*Cross Presentation*) bezeichnet wird (Haan et al., 2000; Heath and Carbone, 2001; Kurts et al., 2001; Pooley et al., 2001; Belz et al., 2005). Obwohl *in vitro*, und neueren Berichten zufolge auch *in vivo*, Makrophagen zu diesem Mechanismus ebenfalls fähig sind (Ramirez and Sigal, 2002; Schliehe et al., 2011), scheinen *in vivo* doch DC vielfach ausschlaggebend für die Einleitung zytotoxischer T-Zell-Immunantworten zu sein (Hildner et al., 2008).

Ferner besitzen DC in Abwesenheit inflammatorischer Signale auch tolerogene Eigenschaften, d.h. sie sind in der Lage, immunogene Reaktionen zu verhindern. Hierbei spielen unter anderem die Induktion von antigenspezifischen induzierbaren T<sub>reg</sub> (iT<sub>reg</sub>) (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007; Iliiev et al., 2009; Kushwah et al., 2009) und die Expansion von natürlichen T<sub>reg</sub> (nT<sub>reg</sub>) eine wichtige Rolle (Darrasse-Jèze et al., 2009; Yamazaki and Steinman, 2009).

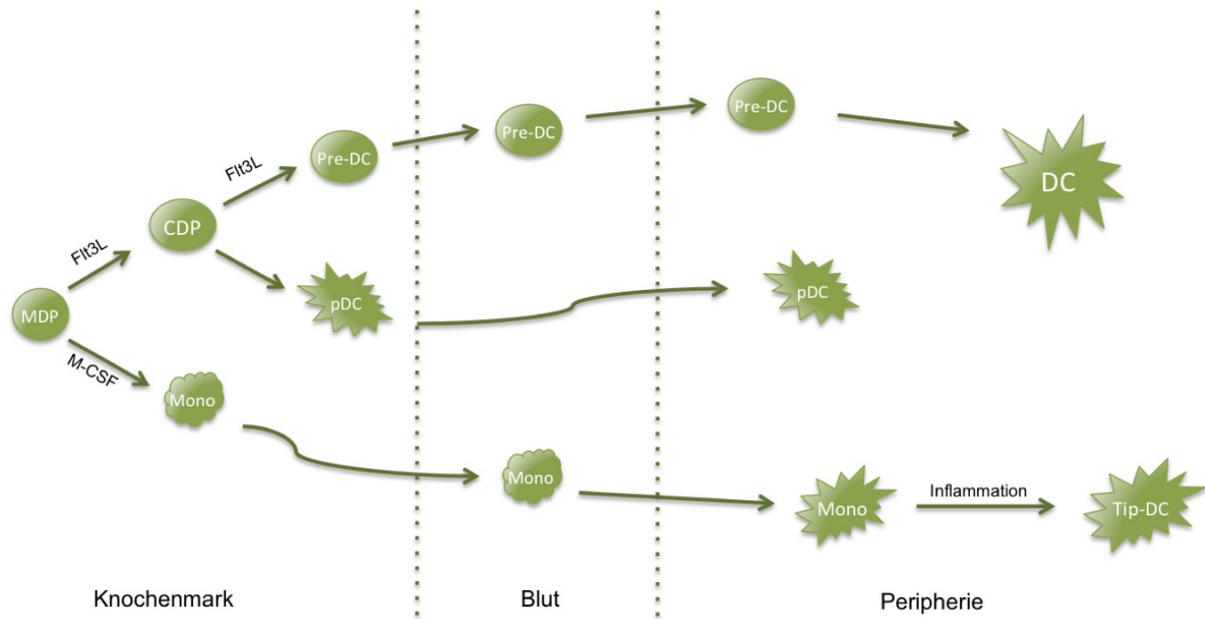
### 1.3.1. Die Entwicklung von DC

Wie alle Leukozyten stammen DC von hämatopoetischen Stammzellen ab. Die auch als Hämozytoblasten bezeichneten Zellen differenzieren frühzeitig in zwei verschiedene Subtypen, die sogenannte gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP) und die gemeinsame myeloide Vorläuferzelle (*common myeloid progenitor*, CMP) (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000). Dabei kann sich eine CLP-Zelle im weiteren Verlauf zu B-Lymphozyten, T-Lymphozyten oder NK-Zellen weiterentwickeln.

Eine CMP-Zelle dagegen besitzt das Potential, in Erythrozyten, Megakaryozyten (die direkten Vorläufer von Thrombozyten), Neutrophile oder Mastzellen auszdifferenzieren; ein weiterer Differenzierungsschritt kann aber auch die Ausbildung einer gemeinsamen Vorläuferzelle für Monozyten, Makrophagen und DC (*macrophage-DC progenitor*, MDP) sein (Fogg et al., 2006). Heute wird davon ausgegangen, dass der Großteil der DC diese Differenzierungsschritte durchläuft und somit myeloiden Ursprungs ist (Manz et al., 2001).

MDP-Zellen können entweder Monozyten ausbilden oder alternativ in gemeinsame DC-Vorläufer (*common DC progenitor*, CDP) ausdifferenzieren, die sich wiederum nur noch zu konventionellen sowie plasmazytoiden DC (pDC) entwickeln können. Als Vorläufer konventioneller DC entstehen jedoch zunächst pre-DC, die das Knochenmark über das Blut verlassen und schließlich in der Peripherie verschiedene Subtypen von DC ausbilden können. Dabei besitzen auch die fertig ausdifferenzierten DC noch eine begrenzte Proliferationskapazität.

Bei einer Halbwertszeit von 5-7 Tagen bei Milz- sowie LK-DC wird der vorhandene Pool durch das Zusammenspiel dreier Prozesse aufrecht erhalten: die Ausdifferenzierung von pre-DC zu DC, limitierte Zellteilung der DC sowie Zelltod nach einer begrenzten Anzahl von Teilungen (Liu et al., 2007a; Liu and Nussenzweig, 2010).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Entwicklung dendritischer Zellen. Modifiziert nach Liu and Nussenzweig, 2010.**

Generell wird die Generierung von DC im „Steady State“, also in Abwesenheit inflammatorischer Signale, durch den Wachstumsfaktor Flt3L (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*) mediiert – und auch limitiert (Hochweller et al., 2009). Dieser wird in den meisten Geweben produziert (Lyman et al., 1994; Brasel et al., 1995). Nach neuesten Erkenntnissen regulieren ausdifferenzierte DC selbst über den Abbau von Flt3L die Ausreifung ihrer Vorläuferzellen (Garbi N., unveröffentlicht).

Unter inflammatorischen Bedingungen spielt jedoch noch ein anderer Entstehungsweg für DC eine Rolle: Die Plastizität der Monozytenpopulation ermöglicht es in diesem Fall, dass Monozyten zu so genannten tip-DC (*TNF $\alpha$  and inducible NO synthase-producing DC*; Synonym: inflammatorische DC, infDC) ausdifferenzieren. Diese sorgen durch die Produktion inflammatorischer Mediatoren wie NO, TNF $\alpha$  sowie ROS (*Reactive Oxygen Species*) für eine frühe Bekämpfung bakteriellen Wachstums (Serbina et al., 2003; Geissmann et al., 2010).

### 1.3.2. Subgruppen von DC

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft und mit Bezug auf einen Review aus dem Jahr 2010 von der Gruppe von Bernard Malissen (Guilliams et al., 2010) kann man DC phänotypisch in fünf Untergruppen unterteilen: I) Langerhans-Zellen, II) CD11b<sup>+</sup>-„like“ DC, III) CD8α<sup>+</sup>-„like“ DC, IV) pDC und V) inflammatorische DC. Dabei ist die Einteilung in diesem System nicht streng markerspezifisch, sondern auch funktionell zu sehen; beispielsweise werden die CD103<sup>+</sup> migratorischen DC zu der Gruppe der CD8α<sup>+</sup>-„like“ DC dazugerechnet aufgrund ihrer Fähigkeit, CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Kreuz-Präsentation zu aktivieren (del Rio et al., 2007; Bedoui et al., 2009; Edelson et al., 2010).

Organ	DC-Subtyp					
	LC	CD11b <sup>+</sup> -like DC	CD8α <sup>+</sup> -like DC	pDC	inf-DC	
Sekundäre lymphatische Organe						Klassische phänotypische Definition
	CD207 <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>	CD207 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>high</sup>	CD207 <sup>+/-</sup> CD8α <sup>+</sup> und/oder CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>-low</sup> CD11c <sup>high</sup>	SiglecH <sup>+</sup> CD11c <sup>low</sup>	Ly6C <sup>+</sup> MAC3 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	
Nicht-lymphatische Gewebe						Klassische phänotypische Definition
	CD207 <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>	CD207 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>high</sup>	CD207 <sup>+/-</sup> CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>-low</sup> CD11c <sup>high</sup>	SiglecH <sup>+</sup> CD11c <sup>low</sup>	Ly6C <sup>+</sup> MAC3 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	
	?	RIG-I/MDA5/DAI <sup>+</sup> NOD/NALP <sup>high</sup> ?	TLR3 <sup>high</sup> ?	TLR7/9 <sup>high</sup>	TLR4/8 <sup>high</sup> NOD/NALP <sup>high</sup> ?	
	?	CD4-T-Zell-Aktivierung, humorale Immunität, Antwort auf extrazelluläre Parasiten	Kreuzpräsentation, CD8-T-Zell-Aktivierung, IL-12p70	Virusabwehr, Typ I-Interferone	Infektionsabwehr, TNF & ROI/NOI	Funktionen und Spezialisierungen

**Abbildung 6: Vereinheitlichendes Modell muriner DC-Subgruppen. Modifiziert nach Guilliams et al., 2010. ROI, radikale Sauerstoff-Intermediate; NOI, NO-Intermediate.**

Dabei bezeichnet CD11c ein in der Maus allen konventionellen DC zugehöriges Epitop, das allerdings nicht exklusiv von DC exprimiert wird. Als Integrin αX (ITGAX) ist es in der Lage, mit ITGB2 (Integrin β2, CD18) zum Komplementrezeptor CR4 zu dimerisieren und inaktivierten Komplementfaktor C3b (iC3b) zu binden.

Auch CD11b (ITGAM, Integrin αM) dimerisiert mit ITGB2 zu einem Komplementrezeptor (CR3), welcher ebenfalls iC3b erkennt. Beiden Komplementrezeptoren gemeinsam ist ihre die Phagozytose

stimulierende Eigenschaft. Bakterien, die an ihrer Oberfläche durch Komplementkomponenten markiert sind, können so effizienter beseitigt werden.

Die Funktionen von CD8 $\alpha$ , welches auf der Oberfläche von DC als Homodimer (Vremec et al., 1992) vorliegt, ebenso wie die von CD4, welches auf CD8 $\alpha$  DC exprimiert sein kann, sind im Gegensatz zu T-Zellen nicht geklärt; möglicherweise besitzen diese Epitope hier keine Funktion. CD8 wurde allerdings in einer Publikation mit der Aktivierung von T-Zellen in einen Kontext gebracht (Hong et al., 2007).

#### 1.4. Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind Moleküle mit einer Länge von 70-100 Aminosäuren (8-14kDa), deren Namensgebung sich von ihrer bekanntesten Aufgabe ableitet, Chemotaxis von Leukozyten zu vermitteln (*chemotaktische Zytokine*). Die Struktur der ersten beiden von insgesamt vier konservierten Cystein-Resten entscheidet hierbei über die Zugehörigkeit zu bestimmten Subgruppen sowie über die sich daraus ableitende systematische Namensgebung; man unterscheidet CC- ( $\beta$ -Familie), CXC- ( $\alpha$ -Familie), C- ( $\gamma$ -Familie), und CX3C- ( $\delta$ -Familie) Chemokine (Zlotnik and Yoshie, 2000). C steht bei dieser Nomenklatur für Cystein, X für eine beliebige andere, nicht mit Cystein identische Aminosäure.

In der Regel wird zwischen konstitutiv exprimierten sowie induzierbaren Chemokinen differenziert. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten Chemokinen, deren Produktion vor allem im „Steady State“ und eher in sekundären lymphatischen Organen stattfindet, werden letztgenannte in der Regel unter inflammatorischen Bedingungen produziert und sind z.B. für die Attraktion von Effektorzellen an Entzündungsherde verantwortlich.

Neben der Funktion, Chemotaxis zu vermitteln, besitzen Chemokine noch zahlreiche weitere Eigenschaften. Um nur einige anzuführen, mediierten manche Chemokine die Aktivierung von Integrinen auf der Oberfläche von Lymphozyten. Die daraus resultierende Änderung der Konformation ermöglichen es den Zellen, beispielsweise an interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) auf Endothelien anzuheften (Alon and Shulman, 2011; Schürpf and Springer, 2011). Für weitere Vertreter wurden costimulatorische bzw. aktivierende Eigenschaften nachgewiesen (Loetscher et al., 1996; Taub et al., 1996a; 1996b; Bandeira-Melo et al., 2001); wieder andere besitzen antimikrobielle Eigenschaften (Hoover et al., 2002; Hieshima et al., 2003).

Speziell in der Milz tragen Chemokine zur Aufrechterhaltung der Architektur von B- und T-Zellzone und somit zum Erhalt der immunologischen Funktion des Organs bei (Forster et al., 1996; 1999; Mori et al., 2001).

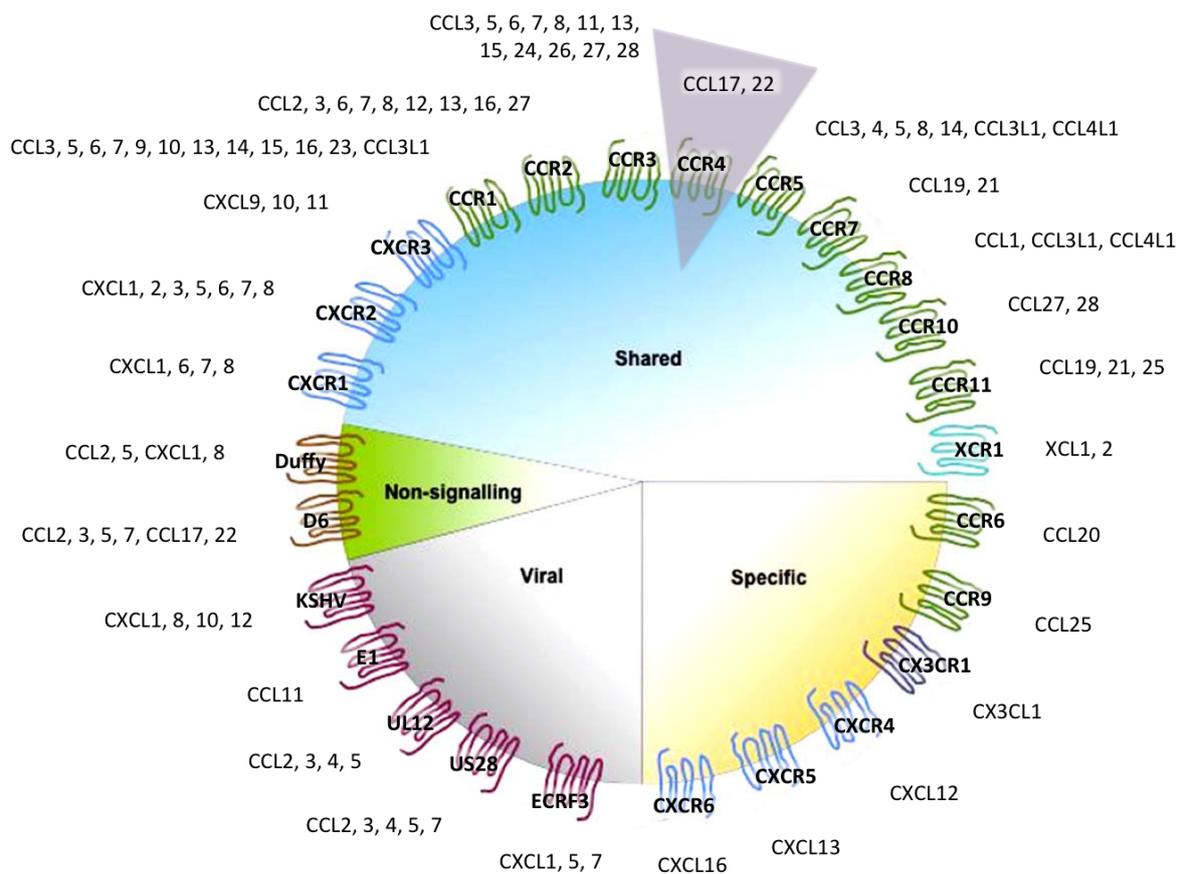


Abbildung 7: Überblick über Chemokine und dazugehörige -Rezeptoren. Modifiziert nach Slettenaar and Wilson, 2006.

Chemokine vermitteln ihre Wirkung durch Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Davon ausgenommen sind die nicht-signalgebenden Rezeptoren. Bei diesen GPCR handelt es sich um heptahelikale, transmembranäre Strukturen (Allen et al., 2007), die in der Plasmamembran verankert sind und intrazellulär mit heterotrimeren G-Proteinen (Guanin-Nukleotid-bindende Proteine) interagieren. Deren Untereinheiten mediieren im weiteren Verlauf die folgende intrazelluläre Signaltransduktion.

### 1.4.1. Das Chemokin CCL17

Bei CCL17 handelt es sich um ein Chemokin aus der Gruppe der CC-Chemokine, welches ebenfalls unter seinem älteren Namen *Thymus and activation-regulated chemokine* bekannt ist.

Bereits 1999 konnte CCL17 als in der Maus weitestgehend DC-spezifisches Chemokin identifiziert werden, welches konstitutiv in Thymus, LK, Darm und Lunge auftritt (Lieberam and Förster, 1999).

Zur weiteren Analyse von Expressionsmuster und Funktion des Chemokins wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Insertion einer EGFP- (*enhanced green fluorescent protein*) Kasette in den murinen CCL17-Lokus eine CCL17-Reportermaus generiert (Alferink et al., 2003). Diese exprimiert EGFP unter der Kontrolle des CCL17-Promoters und führte zu der Erkenntnis, dass CCL17-produzierende DC in primären und sekundären lymphoiden Organen sowie nicht-lymphoiden Geweben zu finden sind: Bereits in unstimulierten Mäusen können CCL17<sup>+</sup> Zellen im Thymus, in den LK, in den Peyer'schen Plaques und in der Lunge nachgewiesen werden. Dabei fällt auf, dass in der Milz keinerlei CCL17-positive Zellen vorkommen und das Chemokin selbst auf RNA-Ebene nicht nachzuweisen ist.

Weiterhin konnte die Produktion von CCL17 auf eine Untergruppe DC zurückgeführt werden, die CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> sind und somit der Gruppe der CD11b-„like“ DC zuzuordnen sind. Durch Stimulation mit TLR-Liganden wie LPS und CpG konnte im Rahmen derselben Arbeit eine Induktion von CCL17 gezeigt werden, wobei das Chemokin wiederum nicht in der Milz nachgewiesen werden konnte, obwohl diese sehr wohl DC der in Frage kommenden Subgruppe beinhaltet.

Weiterhin produzieren aktivierte Langerhans-Zellen (LC) der Haut sowie mittels GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) generierte Knochenmark-DC CCL17 (Xiao et al., 2003a; Fujita et al., 2005; Stutte et al., 2010). Unter gewissen Voraussetzungen kann durch Stimulation ebenfalls eine CCL17-Produktion von CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC in der Milz induziert werden, worauf im späteren Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen werden soll (Semmling et al., 2010).

Im Rahmen einer anderen Publikation konnte CCL17 auch auf RNA- und Proteinebene in murinen Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden (Liddiard et al., 2006). Solche Kulturen beinhalten jedoch in geringem Maß auch DC (Zakharova and Ziegler, 2005), die möglicherweise für die Produktion verantwortlich sein könnten.

Untersuchungen humaner Zellen und Zelllinien zeigten, dass CCL17 im Mensch von weit mehr Zelltypen produziert wird. So wurde das Chemokin unter anderem in B- und T-Zellen, Keratinozyten (HaCaT) sowie Fibroblastenzelllinien (NG1RGB), Endometrium-Epithelzellen, Muskelzellen der Atemwege (HASM cells, *human airway smooth muscle*), Corneal-Fibroblasten und Epithelzellen nasaler Mukosa nachgewiesen (Kumagai et al., 2000; Terada et al., 2001; Yu et al., 2002a; Faffe et al., 2003; Lin et al., 2003; Nasu et al., 2004; Wirnsberger et al., 2006).

Dabei handelt es sich häufig nicht um eine basale, sondern induzierte CCL17-Produktion. CCL17-induzierende Eigenschaften konnten für diverse Zytokine und TLR-Liganden nachgewiesen werden; hier sind die Zytokine IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF, TNF $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , und die TLR-Liganden LPS, Pam<sub>3</sub>Cys CpG und Poly(I:C) zu nennen (Imai et al., 1999; Vestergaard et al., 2000; 2001; Horikawa et al., 2002;

Nomura et al., 2002; Yu et al., 2002a; Alferink et al., 2003; Faffe et al., 2003; Xiao et al., 2003a; 2003b; Inoue et al., 2008).

Dem gegenüber stehen jedoch auch mehrere Quellen, die in verschiedenen Zelltypen eine Herunterregulation von CCL17 durch IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-13 belegen (Yu et al., 2002a; Xiao et al., 2003a; Fujii-Maeda et al., 2004).

Der Mechanismus dieser Interaktionen ist noch nicht für alle Faktoren verstanden. Für IL-4 ist allerdings bekannt, dass die CCL17-Hochregulation in murinen Makrophagen wie in humanen T-Zellen abhängig von STAT-6 (*Signal transducer and activator of transcription-6*) erfolgt, für das der CCL17-Promoter mehrere Bindestellen aufweist (Liddiard et al., 2006; Wirnsberger et al., 2006). Dieser Transkriptionsfaktor mediiert eine Vielzahl der IL-4-Effekte und wird durch Bindung von IL-4 an seinen Rezeptor unter Beteiligung einer Janus-Kinase (JAK) phosphoryliert (Schindler and Darnell, 1995), was zur Dimerisierung und somit Aktivierung und Regulation der Transkription von spezifischen Zielgenen führt (Pernis et al., 1995; Kaplan et al., 1996; Takeda et al., 1996).

Im Falle der TLR-Liganden wie auch für TNF $\alpha$  lässt sich die Induktion über einen NF- $\kappa$ B-abhängigen Signalweg erklären (Medzhitov et al., 1997). Dieser Transkriptionsfaktor liegt im Zytosol in einem inaktiven Komplex mit dem Protein I $\kappa$ B $\alpha$  vor und kann durch die Aktivierung des Enzyms IKK (I $\kappa$ B-Kinase) infolge der Signaltransduktion durch Rezeptorbindung freigesetzt werden. Der so aktivierte Komplex reguliert im Zellkern über die Bindung responsiver Elemente in DNA-Sequenzen ebenfalls die Transkription einer Vielzahl von Genen, unter anderem CCL17 (Nakayama et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Regulation von CCL17 offensichtlich streng zelltypspezifisch und organspezifisch erfolgt.

#### **1.4.2. Wirkung von CCL17**

CCL17 vermittelt seine Wirkung über eine Interaktion mit dem G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor CCR4 (s. Abb. 7) (Imai et al., 1997; 1998).

Die Expression dieses Rezeptors wurde für zahlreiche Zelltypen nachgewiesen. Unter anderem besitzen aktivierte sowie Gedächtnis-T<sub>H</sub>2-Zellen, T<sub>reg</sub>, einige CTL, Makrophagen, NK T-Zellen, Thrombozyten, Mastzellen und DC selbst diesen Rezeptor und können somit durch CCL17 rekrutiert werden (D'Ambrosio et al., 1998; Imai et al., 1999; Chvatchko et al., 2000; Clemetson et al., 2000; Iellem et al., 2001; Juremalm et al., 2002; Kim et al., 2002; Kondo and Takiguchi, 2009; Stutte et al., 2010; Semmling et al., 2010; Poppensieker et al., 2012). Auch für Basophile wurde die Expression von CCR4 diskutiert (Power et al., 1995; Hoogewerf et al., 1996); diese Beobachtung konnte von anderen

Gruppen jedoch nicht bestätigt werden (Ugucconi et al., 1997; Heinemann et al., 2000; Iikura et al., 2001).

Weiterhin wird die Frage diskutiert, ob für CCL17 neben CCR4 noch ein weiterer Rezeptor existiert. Vorgeschlagen wurde beispielsweise eine Interaktion mit CCR8; diese Annahme gilt aber mittlerweile als widerlegt (Bernardini et al., 1998; Garlisi et al., 1999). Allerdings ist die Tatsache, dass CCL17-defiziente Mäuse einen Phänotyp im Mausmodell für atopische Dermatitis (AD) zeigen, während sich CCR4-defiziente Tiere nicht von Wildtypmäusen unterscheiden, ein starker Indikator für die Existenz eines weiteren Rezeptors (Stutte et al., 2010). Dieser auf der Oberfläche dermalen DC vermutete, bislang nicht identifizierte Rezeptor scheint aber eher indirekt die Migration der DC zu beeinflussen; eine auto- bzw. parakrine Bindung von CCL17 bewirkt anscheinend eine Sensibilisierung der DC für die Chemokine CCL19, CCL21 und CXCL12, die dann sekundär eine Migration in die LK ermöglichen.

CCL17 selbst oder CCR4 werden immer wieder mit  $T_H2$ -Immunantworten in Verbindung gebracht; das Chemokin spielt zum Beispiel bei der Abwehr von Fadenwürmern eine Rolle (Specht et al., 2011). Allerdings ist die Assoziation mit  $T_H2$ -Erkrankungen nicht absolut. In verschiedenen weiteren z.B. virale Erkrankungen wie Hepatitis C, Epstein-Barr oder Dengue-Fieber scheint CCL17 ebenfalls involviert zu sein (Nakayama et al., 2004; Guabiraba et al., 2010; Riezu-Boj et al., 2011).

Daneben kommt es im Rahmen fehlgeleiteter Immunreaktionen ebenfalls häufig zu einer erhöhten Expression von CCL17. Als Beispiele sind Erkrankungen des atopischen Formenkreis wie allergisches Asthma oder AD zu nennen, bei denen sich teilweise deutliche Korrelationen zwischen Schweregrad der Erkrankung und CCL17-Serumspiegeln finden (Kakinuma et al., 2001; Lin et al., 2003; Hijnen et al., 2004; Perros et al., 2009; Kwon et al., 2010; Morita et al., 2010; Vijayanand et al., 2010). Aber auch beim Hodgkin-Lymphom, Lupus erythematosus, bullösem Pemphigoid, Colitis und Arteriosklerose spielt es eine Rolle (van den Berg et al., 1999; Kakinuma et al., 2003; Okamoto et al., 2003; Weihrauch et al., 2005; Heiseke et al., 2011; Weber et al., 2011).

Schließlich ist CCL17 aber auch am physiologischen Geschehen beteiligt, beispielsweise spielt es eine Rolle in der Hämostase: Thrombozyten enthalten selber CCL17 und reagieren auf seine Freisetzung wie auch auf die von CCL22 mit Aggregation (Abi-Younes et al., 2001; Fujisawa et al., 2002). Eine mögliche Verbindung ist aber in der Beteiligung von Thrombozyten an verschiedenen immunologischen Aufgaben zu sehen: Mittels TLRs sind sie in der Lage, Pathogene zu erkennen und zu umhüllen (Shiraki et al., 2004), zusätzlich nehmen sie aktiv am Entzündungsgeschehen bei verschiedenen Krankheiten teil (Gear and Camerini, 2003; Hundelshausen, 2007; Kasperska-Zajac et al., 2008; Katoh, 2009) und können somit als Bindeglied zwischen Blutgerinnung und Immunsystem gesehen werden.

### 1.4.3. Verwandtschaft mit CCL22

CCL22 ist der systematische Name für das *Macrophage-derived Chemokine*. Es beschreibt ein Chemokin, welches eine hohe Sequenzidentität mit CCL17 besitzt und ebenso wie dieses auf dem murinen Chromosom 8q lokalisiert ist. Wie CCL17 vermittelt es seine Wirkung über den Rezeptor CCR4 (s. Abb. 7) und erreicht somit dasselbe Spektrum an Zellen. Im Menschen bilden DC die Hauptquelle für CCL22. Aber auch B-Zellen und andere Zellen exprimieren CCL22. Zudem werden erhöhte CCL22-Spiegel mit einem Krankheitsspektrum in Verbindung gebracht, das dem CCL17-assoziierten ähnelt (Vulcano et al., 2001; Nakayama et al., 2004; Hashimoto et al., 2006; Yanai et al., 2007; Nakazato et al., 2008; Perros et al., 2009).

Eine weitere Parallele zwischen den beiden Chemokinen besteht in der beschriebenen differentiellen Regulation von murinem CCL22 zwischen LC der Haut und Milz-DC (Fujita et al., 2005), so dass an verschiedenen Stellen dieser Arbeit Untersuchungen zur Regulation von CCL17 in der Milz ebenfalls auf CCL22 ausgeweitet wurden.

## 1.5. miRNA

micro-RNA, oder kurz miRNA, sind kurze, ca. 20-25 Nukleotide umfassende RNA-Moleküle, die an der posttranskriptionellen Regulation von Genen beteiligt sind (Williams, 2008). Ihre Vorläufer, die häufig noch über 1 kb langen, so genannten pri-miRNA (primary micro-RNA), werden meist zusammen mit anderen Genen zusammen transkribiert. Es folgt eine Spaltung durch die RNase Drosha zur 60-70 Nukleotide langen pre-miRNA (precursor micro-RNA).

Eine weitere RNase, Dicer, spaltet daraus die finale miRNA ab. Diese wird in einen Enzymkomplex namens RISC (*RNA-induced silencing complex*) aufgenommen und aktiviert diesen (Pratt and MacRae, 2009). Findet sich eine Target-mRNA, die im Bereich der 3'-UTR eine Komplementarität zur miRNA aufweist, so kann ihr Schicksal in zweierlei Weise beeinflusst werden: Bei einer partiellen Komplementarität erfolgt lediglich eine Translationshemmung durch die Bindung, eine hohe Komplementarität führt dagegen zur Degradation der mRNA.

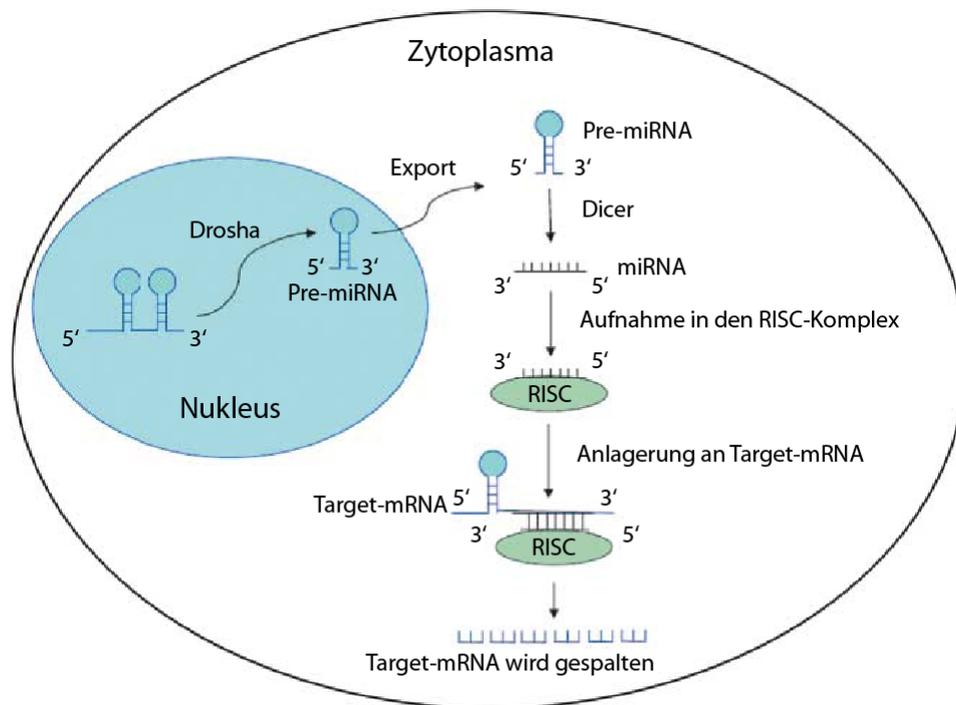


Abbildung 8: Schematische Darstellung zur Entstehung und Funktion von miRNA. Modifiziert nach He et al., 2009.

Da die Komplementarität zwischen miRNA und mRNA für eine Bindung nicht perfekt sein muss, ergeben sich häufig mehrere mögliche Targets für eine bestimmte miRNA. Voraussagen über mögliche Interaktionen können mit Hilfe der Online-Datenbank Targetscan getroffen werden.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein besseres Verständnis der Rolle des Chemokins CCL17 und der CCL17-produzierenden DC zu erlangen. Untersuchungen an gentechnisch veränderten Mäusen sollten eine detaillierte Analyse regulatorischer und funktioneller Aspekte ermöglichen.

Im Einzelnen sollten die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Bestehen Unterschiede in der Genexpression und Funktion von CCL17-negativen Milz-DC und CCL17-positiven DC peripherer Organe? Gibt es zelltypspezifisch charakteristische, differentiell transkribierte miRNAs, die die Abweichungen im mRNA-Expressionsmuster verursachen?
2. Wodurch wird die Produktion von CCL17 in der Milz unterbunden? Kann CCL17 hier überhaupt durch Stimulation hochreguliert werden, und wie ist der Mechanismus?
3. Hat eine Einflussnahme auf die CCL17-Expression in der Milz Konsequenzen für den Organismus? Kommt es zu einer Verbesserung oder Verschlechterung der humoralen Immunantwort, der Ausbildung einer zellulären Antwort, der Überlebensfähigkeit bei septischen Krankheitsbildern?

Die gewonnenen Befunde sollen Aufschluss über die Funktion Milz-spezifischer DC-Populationen und des organspezifischen Mikroklimas geben. Eine Eingriffnahme auf das Zytokin- und Chemokinprofil soll im Hinblick auf Nutzen oder Schaden einer künstlich hervorgerufenen Veränderung beurteilt werden, um langfristig mögliche Therapieoptionen zu erschließen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer/Zellsorter FACS Aria	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Reader EL800	BioTek, Bad Friedrichshall
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Grobwaage Kern 440-35N	Kern, Balingen Frommern
Inkubator Heraeus 150	Heraeus, Hanau
Kryostat Leica CM 3050 S	Leica, Wetzlar
Mikroskop Zeiss Observer D1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer	Nanodrop, Wilmington, Delaware, USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Thermocycler Biometra T1	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau

#### 2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

$\alpha$ -Galactosylceramid	Axxora, Lörrach
Aceton	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Seelze
BSA	Serva, Heidelberg

---

CpG	TIB Molbiol, Berlin
DABCO	Roth, Karlsruhe
DAPI	Calbiochem / Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma Aldrich, Seelze
Ethanol	Sigma Aldrich, Seelze
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
L-Glutamin-Lsg. (200 mM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Imject® Alum	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Isofluran	Actavis, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
LPS	Sigma Aldrich, Seelze
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Ovalbumin	Sigma Aldrich, Seelze
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Biochrom, Berlin
PBS-57	Paul B. Savage, Utah ((Liu et al., 2006))
Penicillin-Steptomycin-Lösung (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pneumococcal Cell Wall Polysaccharide (CWPS)	Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
Pneumococcal Polysaccharide Type 19 Powder	ATCC, Wesel
Pneumovax® 23	Aventis Pasteur MSD GmbH, Leimen
RPMI 1640-Medium (mit Glutamin)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Saccharose	Sigma Aldrich, Seelze
Schwefelsäure, 25%	Roth, Karlsruhe
SIINFEKL (OVA-Peptid 257-264)	Proimmune, Oxford, United Kingdom
TMB One Substrat für ELISA	Kem-En-Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark

TMB Plus Substrat für ELISA	Kem-En-Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich, Seelze

### 2.1.3. Enzyme

DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Kollagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.1.4. Lösungen und Puffer

ACT	17 mM	Tris
	160 mM	NH <sub>4</sub> Cl
		H <sub>2</sub> O
	auf pH 7,2 einstellen	
DAPI-Lösung	1 mg/ml	DAPI
		Methanol
	vor Gebrauch 1:5000 in PBS verdünnen	
Kochsalz-Lösung 0,9% (w/v)	0,9 g	NaCl
	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O
Kollagenase-Lösung	1 mg/mL	Kollagenase D
	300 U/mL	DNase I
		PBS

---

Mowiol	6 g	Glycerin
	2,4 g	Mowiol 4-88
	6 ml	H <sub>2</sub> O
	12 ml	0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)
	25 mg/ml	DABCO
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,09 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		H <sub>2</sub> O
	auf pH 7,4 einstellen	
PFA-Lösung 4%	4 g	Paraformaldehyd
	ad 100 ml	PBS
Running Buffer	2mM	EDTA
	0,5%	FCS
		PBS
Saccharose-Lösung 5% (w/v)	5 g	Saccharose
	ad 100 ml	PBS
Saccharose-Lösung 10% (w/v)	10 g	Saccharose
	ad 100 ml	PBS
Saccharose-Lösung 20% (w/v)	20 g	Saccharose
	ad 100 ml	PBS

TE-Puffer	100 mM	Tris
	10 mM	EDTA
		H <sub>2</sub> O
	auf pH 8,0 einstellen	
Waschpuffer für ELISA	0,5% (v/v)	Tween 20
		PBS

### 2.1.5. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Quelle	Konzentration	Verdünnung
<b>CD11c</b>	APC	N418	eBioscience	0,2 mg/ml	1:200
<b>CD11b</b>	PerCP	M1/70	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200
<b>I-A/I-E (MHC II)</b>	PE	M5/114.15.2	eBioscience	0,2 mg/ml	1:1000
<b>CD4</b>	APC	RM4-5	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200
<b>CD8a</b>	PE	53-6.7	eBioscience	0,2 mg/ml	1:200
<b>NK1.1</b>	PE	PK136	BD Pharmingen	0,2 mg/ml	1:200
<b>CD119 (IFNGR)</b>	Biotin	GR20	BD Pharmingen	0,5 mg/ml	1:200
<b>CD317</b>	APC	927	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200
<b>B220</b>	APC/Cy7	RA3-6B2	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200
<b>F4/80</b>	APC	BM8	eBioscience	0,2 mg/ml	1:200
<b>Gr1</b>	PE	Gr-1	eBioscience	0,2 mg/ml	1:200
<b>IFNAR</b>	APC	MAR1-5A3	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200
<b>CD16/32 (Fc-Block)</b>	Purified	93	BioLegend	0,5 mg/ml	1:200
<b>Siglec-H</b>	PerCP	551	BioLegend	0,2 mg/ml	1:100

Alle genannten Spezifitäten beziehen sich auf murine Epitope.

### 2.1.6. Primärantikörper für die Histologie

Spezifität	Konjugat	Klon	Quelle	Konzentration	Verdünnung
<b>B220</b>	Purified	RA3-6B2 (Ratten-IgG)	eBioscience	0,5 mg/ml	1:200
<b>GFP</b>	Purified	polyklonal (Kaninchen-IgG)	Invitrogen	2 mg/ml	1:200
<b>CD90.2 (Thy1.2)</b>	Biotin	30-H12	BioLegend	0,5 mg/ml	1:200

Alle genannten Spezifitäten beziehen sich auf murine Epitope.

### 2.1.7. Sekundärantikörper für die Histologie

Spezifität	Konjugat	Klon	Quelle	Konzentration	Verdünnung
<b>Kaninchen Ig</b>	Alexa 488	polyklonal (Ziegen-IgG)	Invitrogen	2 mg/ml	1:200
<b>Ratten Ig</b>	Alexa 594	polyklonal (Esel-IgG)	Invitrogen	2 mg/ml	1:200
<b>Biotin</b>	Alexa 594	(Streptavidin)	Invitrogen	2 mg/ml	1:200

### 2.1.8. Antikörper für ELISA

Spezifität	Konjugat	Klon	Quelle	Konzentration
<b>IgM</b>	Purified	II/41	BD Pharmingen	2 µg/ml
<b>IgM</b>	Biotin	R6-60.2	BD Pharmingen	1 µg/ml
<b>IgE</b>	Purified	R35-72	BD Pharmingen	2 µg/ml
<b>IgE</b>	Biotin	R35-118	BD Pharmingen	1 µg/ml
<b>IgG1</b>	Purified	A85-3	BD Pharmingen	2 µg/ml
<b>IgG1</b>	Biotin	A85-1	BD Pharmingen	1 µg/ml
<b>IgG2a</b>	Purified	R11-89	BD Pharmingen	2 µg/ml
<b>IgG2a</b>	Biotin	R1915	BD Pharmingen	1 µg/ml
<b>IgG2b</b>	Purified	R9-91	BD Pharmingen	2 µg/ml
<b>IgG2b</b>	Biotin	R12-3	BD Pharmingen	1 µg/ml
<b>IgG3</b>	Purified	R2-38	BD Pharmingen	2 µg/ml
<b>IgG3</b>	Biotin	R4082	BD Pharmingen	1 µg/ml

Alle genannten Spezifitäten beziehen sich auf murine Immunglobuline.

### 2.1.9. Standards für ELISA

Isotyp	Konjugat	Klon	Quelle
<b>IgM</b>	Purified	C48-6	BD Pharmingen
<b>IgE</b>	Purified	C38-2	BD Pharmingen
<b>IgG1</b>	Purified	MOPC-31C	BD Pharmingen
<b>IgG2a</b>	Purified	G155-178	BD Pharmingen
<b>IgG2b</b>	Purified	C48-4	BD Pharmingen
<b>IgG3</b>	Purified	A112-3	BD Pharmingen

### 2.1.10. Neutralisierende Antikörper für die *in vivo*-Injektion

anti-mGM-CSF	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
anti-mIL-4	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt

### 2.1.11. Zytokine

GM-CSF	Peprotech, Hamburg
IFN- $\gamma$	Peprotech, Hamburg
IL-4	Peprotech, Hamburg
IL-13	Peprotech, Hamburg
TNF $\alpha$	Peprotech, Hamburg

### 2.1.12. Medium

RPMI-Medium für die Zellkultur	50 ml	FCS
	500 ml	RPMI-Medium
	5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100x) (Endkonzentration: Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 0,1 mg/ml)
	2,5 $\mu$ l	$\beta$ -Mercaptoethanol
	5 ml	L-Glutamin-Lsg. (Endkonzentration 2 mM)

### 2.1.13. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Cell Strainer 100 $\mu$ m	BD Biosciences, Heidelberg
DuoSet ELISA-Kit für CCL17	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
DuoSet ELISA-Kit für CCL22	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
DuoSet ELISA-Kit für IL-4	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
DuoSet ELISA-Kit für IL-6	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt

DuoSet ELISA-Kit für IL-10	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
DuoSet ELISA-Kit für IFN- $\gamma$	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
DuoSet ELISA-Kit für GM-CSF	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
DuoSet ELISA-Kit für TNF $\alpha$	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
ELISA-Platten, 96-well	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Glasphiolen (Borosilikat)	Roth, Karlsruhe
ImmEdge Pen	Vector Labs, United Kingdom
MACS-Säulen, LS	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACS-Beads, anti-CD11c	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Nahtmaterial Nylon, 7/0 USP, DSM 11/13	Resorba, Nürnberg
Plastipak 1 ml-Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
Reagiergefäße 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 15 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Freezing Medium	Jung, Leica Microsystems, Nussloch
Venenverweilkanülen BD Venflon 14G/16G	BD Biosciences, Heidelberg

Sofern nicht gesondert aufgeführt, wurde weiteres Verbrauchsmaterial wie Pipetten, Pipettenspitzen etc. von Falcon, Greiner oder Sarstedt bezogen.

#### **2.1.14. Verwendete Software**

AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo 7.5	Tree Star, Oregon, USA
Gen5	BioTek, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, California, USA
Pages 4.1	Apple, Cupertino, California, USA
Papers 2 for Mac	Mekentosj, Aalsmeer, Niederlande

### 2.1.15. Verwendete Online-Datenbanken

DAVID	<a href="http://www.david.abcc.ncifcrf.gov">www.david.abcc.ncifcrf.gov</a>
FunNet	<a href="http://www.funnet.info">www.funnet.info</a>
Gene Ontology	<a href="http://www.geneontology.org">www.geneontology.org</a>
KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg">www.genome.jp/kegg</a>
Targetscan	<a href="http://www.targetscan.org">www.targetscan.org</a>

### 2.1.16. Versuchstiere

Es wurden folgende Mausstämme verwendet:

Mauslinie	Hintergrund	Referenz
WT	C57BL/6J Balb/c C3HeB/FeJ	
CCL17 <sup>E/+</sup>	C57BL/6J Balb/c	Alferink et al., 2001
CCL17 <sup>E/E</sup>	C57BL/6J Balb/c C3HeB/FeJ	Alferink et al., 2001
IFNgR <sup>-/-</sup>	C57BL/6J	Huang et al., 1993
IFNgR <sup>-/-</sup> x CCL17 <sup>E/+</sup>	C57BL/6J	I. Förster unveröffentlicht
IFNgR <sup>-/-</sup> x CCL17 <sup>E/E</sup>	C57BL/6J	I. Förster unveröffentlicht
CCL17 <sup>+ /DTR</sup>	C57BL/6J	I. Förster unveröffentlicht
GM-CSF <sup>-/-</sup>	C57BL/6J	Stanley et al., 1994
LTβR <sup>-/-</sup>	C3HeB/FeJ	Fütterer et al., 1998

E → EGFP

Für die Experimente wurden weibliche Tiere im Alter von 8-12 Wochen eingesetzt. Die Zucht erfolgte im institutseigenen Tierhaus des IUF unter SPF-Bedingungen. Hierbei standen Wasser und Futter (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest) zur freien Verfügung. Die GM-CSF-defizienten Tiere wurden ursprünglich von Jackson bezogen und durch Burkhard Becher zur Verfügung gestellt.

Alle Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt und unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung mit Trypanblau

Die Zellsuspension wurde zunächst in einer 96-Well-Platte im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau-Lösung versetzt. 10 µL dieser Mischung wurden anschließend unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Unter dem Lichtmikroskop erschienen nun die lebendigen Zellen farblos auf blauem Hintergrund; die toten Zellen nahmen dagegen den blauen Farbstoff auf.

Nun konnten mit Hilfe der speziell geschliffenen Zählkammer, welche eine Aufteilung in 3x3 große Quadrate besitzt und diese wiederum in je 4x4 kleine Quadrate unterteilt sind, insgesamt 16 der kleinen Felder aus den vier großen Quadraten an den Ecken ausgezählt werden.

Die Konzentration der zu bestimmenden Zellen errechnete sich wie folgt:

$$\text{Konzentration} = \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

Unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens konnte so die Zellzahl ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl} = \text{Konzentration} \times \text{Volumen}$$

### 2.2.2. Isolierung von Zellen aus lymphatischen Organen

Abhängig vom Experiment wurden Milz, mesenteriale, brachiale, inguinale, axilläre Lymphknoten oder der Thymus entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden die Organe in eine Lösung aus Kollagenase D und DNase I überführt und mit dem Stempel einer Spritze grob zerkleinert. Um der Kollagenase optimale Bedingungen zu bieten, erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 15 Minuten.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Organe soweit wie möglich durch Pipettieren suspendiert und durch ein Zellsieb gegeben. Eventuelle Rückstände wurden erneut mit einem Stempel zerdrückt, bis alle Zellen vollständig vereinzelt vorlagen. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde abschließend für 5 Minuten bei 1200 rpm (300 g) zentrifugiert und das Zellpellet in PBS resuspendiert, um die Kollagenase auszuwaschen.

### **2.2.3. Erythrozytenlyse**

Für manche Experimente war es notwendig, die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien.

Dafür wurde die jeweilige Suspension zunächst abzentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml ACT-Puffer resuspendiert. Durch die Hypotonizität des Puffers kommt es zum Platzen der Erythrozyten. Es erfolgte eine Inkubation von 2 Minuten bei 37°C im Wasserbad; danach wurde der physiologische osmotische Druck durch Zugabe eines ausreichenden Volumens PBS wieder hergestellt. Die Suspension wurde abschließend für 8 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert.

### **2.2.4. Anreicherung von DC durch MACS**

Beim Magnetic-activated Cell Sorting können Zellen unter Verwendung von Antikörpern, die mit magnetischen Beads gekoppelt sind, einfach anhand ihrer Oberflächenstrukturen aufgereinigt werden.

Die Herstellung einer Einzelzellsuspension erfolgte wie zuvor beschrieben. Danach wurde die betreffende Zellsuspension zunächst abzentrifugiert und das Zellpellet in Running Buffer resuspendiert (Milz in 300 µl, LK in 200 µl). Dann erfolgte eine Zugabe von Fc-Block im Verhältnis 1:100 und eine kurze Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Anschließend wurden gegen CD11c gerichtete MACS-Beads im Verhältnis 1:10 zugesetzt (also für Milzen 30 µl, für LK 20 µl), leicht umgeschwenkt und die Suspension bei 4°C für 20 Minuten inkubiert.

Nach einem Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml Running Buffer aufgenommen und auf die zuvor äquilibrierte und in einen Magneten gesteckte MACS-Säule gegeben. Dreimaliges Waschen mit je 1 ml Running Buffer sollte dabei die nicht an Beads gebundenen Zellen aus der Säule spülen, während die mit den magnetischen Beads gekoppelten Zellen auf der Säule gehalten wurden.

Abschließend wurde die Säule von dem Magneten getrennt und die auf der Säule verbliebenen Zellen mit 3 ml Running Buffer eluiert.

### **2.2.5. Kultivierung und Stimulation von *ex vivo*-DC**

Die Zellen wurden aus der Milz isoliert und DC mittels MACS mit CD11c-Beads angereichert, wie zuvor beschrieben. Nun wurden  $2 \times 10^5$  der angereicherten DC einer FACS-Färbung für CD11c und

MHC II unterzogen und die Effizienz der Anreicherung mittels Berechnung des Anteils der CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> Zellen an allen lebenden Zellen bestimmt. So konnte auf die Gesamtzahl der DC rückgeschlossen werden.

Für die Kultivierung wurden nun je  $2 \times 10^5$  DC in 200  $\mu$ L RPMI-Medium pro Well einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Gegebenenfalls erfolgte eine Stimulation durch Zusatz von 10 ng/ml GM-CSF, IL-4, IL-13, TNF $\alpha$  oder Kombinationen mehrerer Zytokine ins Medium.

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände abgenommen und für spätere Untersuchungen mittels ELISA eingefroren, oder die Zellen wurden einer FACS-Färbung unterzogen und durchflusszytometrisch ausgewertet.

### **2.2.6. Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden in dieser Arbeit Zellsuspensionen aus isolierten Organen (Milz, LK), Knochenmarkkulturen sowie Blutproben auf ihre Zusammensetzung hin untersucht.

Bei dieser Technologie werden die Zellen der zu analysierenden Suspension zunächst hydrodynamisch fokussiert, und passieren das Licht eines oder mehrerer Laser. Hierbei geben bereits das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht Aufschluss über die Größe und Granularität der Zellen; weitere Informationen können aus vorher durchgeführten FACS-Färbungen gezogen werden. Dafür werden meist monoklonale Antikörper verwendet, die sich gegen Strukturen auf oder in der Zelle richten können, und die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Werden nun bei der Passage des Laserlichts diese Fluorochrome angeregt, kommt es zu einer Emission von Fluoreszenzlicht, die mit Hilfe spezieller Detektoren gemessen werden kann.

Die Probengewinnung und -aufbereitung erfolgte zunächst, wie unter 2.2.2 beschrieben. Teilweise folgten eine Lyse von Erythrozyten sowie eine Anreicherung einzelner Populationen mittels MACS.

Für die FACS-Färbung wurden dann in der Regel  $2 \times 10^5$ , für manche Experimente auch eine größere Zahl Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 g konnte der Überstand vom Zellpellet abgetrennt und durch 0,5  $\mu$ g Fc-Block in einem Volumen von 50  $\mu$ l PBS ersetzt werden. Diese Mischung wurde für 10 Minuten bei 4°C inkubiert und sollte unspezifische Bindungen der später dazugegebenen Antikörper über den Fc-Rezeptor verhindern. In der Zwischenzeit wurde die Färbelösung hergestellt, die die zu färbenden Antikörper in PBS verdünnt enthält. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der Färbelösung ohne Waschen zu den Proben hinzugefügt und diese für weitere 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Konnte aus versuchsbedingten Gründen die Messung nicht mehr am selben Tag durchgeführt werden, wurden die Zellen fixiert, indem beim letzten Waschen nicht PBS, sondern 1% PFA in PBS zur Resuspendierung des Zellpellets verwendet wurde. Die Lagerung bis zum Messen erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

### **2.2.7. Zell-Sort**

Für das Experiment wurden jeweils 10-15 Mäuse des Genotyps CCL17<sup>E/+</sup> mit LPS vorbehandelt, um eine Aktivierung von Milz-DC und damit eine Angleichung an den Reifezustand der DC in den LK zu erzielen.

Nach 15 Stunden wurden Milzen sowie brachiale, inguinale, axilläre und mesenteriale Lymphknoten der Tiere entnommen und jeweils gepoolt. Sämtliche weiterführenden Schritte erfolgten auf Eis.

Zunächst wurden Milz- und LK-Einzellsuspensionen hergestellt und dann bereits eine grobe Voranreicherung mittels MACS mit CD11c-Beads durchgeführt, wie bereits beschrieben.

Anschließend wurde eine FACS-Färbung der Zellsuspensionen unter Verwendung von anti-CD11c-APC-, anti-CD11b-PerCP-, anti-CD8α-PE- und anti-NK1.1-PE-Antikörpern vorgenommen.

Der Sort selbst wurde in Kooperation mit Dr. Daniel Degrandi und Dr. Philipp Dresing aus dem Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene durchgeführt. Dabei wurden CD8α- und NK1.1-positive Zellen verworfen, um NK-Zellen, IKDC (Chaput et al., 2006; Caminschi et al., 2007) und CD8α<sup>+</sup> DC auszuschließen. Gleichzeitig wurden CD11c<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> DC angereichert und nochmal anhand der eGFP-Fluoreszenz zwischen CCL17-positiven und -negativen DC differenziert.

Nach erfolgtem Sort wurden die Zellen kurz abzentrifugiert und anschließend in Trizol resuspendiert (1x10<sup>6</sup> LK-DC/ml, 1x10<sup>7</sup> Milz-DC/ml) und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung durch die Bonner AG Schultz gelagert.

### **2.2.8. Anfertigung von Gefrierschnitten**

Nach der Entnahme mussten die Präparate zuerst durch ein spezielles Protokoll fixiert werden, um die Diffusion des eGFP-Moleküls aus den Zellen zu verhindern. Zunächst wurden die Organe in 4%PFA/PBS für drei Stunden (bei Raumtemperatur) fixiert. Danach folgte ein Saccharose-Gradient, bei dem die Präparate zunächst für je 1 Stunde in 5 bzw. 10%iger Saccharose-Lösung (RT), dann über Nacht in 20%iger Saccharose-Lösung (4°C) aufbewahrt wurden.

Am nächsten Tag wurden die Präparate mit Hilfe von Einbettmedium (Tissue Tek) in Plastikschrälchen eingebettet und auf Trockeneis eingefroren.

Mit Hilfe des Kryostats konnten anschließend 7 µm dicke Schnitte angefertigt werden, die auf Objektträger aufgenommen und nach dem Trocknen für 5 Minuten in eiskaltem Aceton entfettet und anschließend für histologische Färbungen bei -20°C eingefroren wurden.

### **2.2.9. Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten**

Die auf die zuvor beschriebene Weise gewonnenen Schnitte wurden zunächst aufgetaut und kurz in PBS rehydriert. Es erfolgte ein dreißigminütiger Blockier-Schritt, in dem unspezifische Bindungen mit 5% BSA/PBS abgesättigt wurden.

Anschließend wurden die jeweiligen Primärantikörper, in der Regel anti-B220 (Ratte) und anti-GFP (Kaninchen), 1:200 in 1 % BSA/PBS verdünnt und 100 µL dieser Lösung auf jeden Schnitt gegeben; die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei RT in einer wasserdampfeuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte für je 5 Minuten in PBS wurden die Sekundärantikörper, meist anti-Kaninchen Alexa 488 (Ziege) und anti-Ratte Alexa 594 (Esel), wiederum 1:200 verdünnt und ebenfalls 100 µL pro Schnitt unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Schnitte für fünf Minuten in einer Lösung von 0,2 µg/ml DAPI in PBS gegengefärbt, danach die Schnitte dreimal mit PBS und abschließend einmal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und danach an der Luft unter Ausschluss von Licht getrocknet.

Abschließend wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt und wiederum zum Trocknen bei RT im Dunkeln gelagert. Die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte in der Regel am nächsten Tag, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

### **2.2.10. ELISA**

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, kurz ELISA, beschreibt ein immunologisches Verfahren, bei dem die Anwesenheit gelöster Bestandteile in Proben durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht wird und so die Konzentration quantitativ bestimmt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Anwendung zur Detektion von Zytokinen (IL-4, IL-6), Chemokinen (CCL17, CCL22) oder Immunglobulinen (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3).

### ***Sandwich-ELISA***

Beim so genannten Sandwich-ELISA wurde zunächst eine ELISA-Mikrotiterplatte mit einem in PBS gelösten Antikörper gegen das gesuchte Protein beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssiger, nicht gebundener Antikörper mit Waschpuffer ausgewaschen und die Platte zunächst mit einer Lösung von 1% BSA in PBS für 2 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach erneutem Waschen wurden die jeweiligen zu testenden Proben sowie eine Verdünnungsreihe eines Standards auf die Platte aufgetragen und wiederum für 2 h bei RT inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift, nach dem ein weiterer gegen die gesuchte Komponente gerichteter Biotin-gekoppelter Antikörper zugegeben wurde. In einem weiteren Schritt wurde eine Lösung Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase zugesetzt, die nun über die starke nichtkovalente Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an das Antikörper-Protein-Antikörper-„Sandwich“ binden konnte. Die Peroxidase wurde letztendlich für die Umsetzung des Substrats TMB (Tetramethylbenzidin; TMB One zur Detektion von Immunglobulinen, TMB Plus bei Zytokinen) zu einem blauen Farbstoff genutzt. Die Reaktion wurde schließlich mit 2N Schwefelsäure abgestoppt, was einen Farbumschlag nach gelb zur Folge hatte. Die Farbintensität konnte nun über die Absorption photometrisch bei 450 nm ausgelesen werden; hierbei war die Intensität proportional zum umgesetzten Substrat und somit zum zu bestimmenden Protein.

### ***Antigenspezifischer ELISA***

a) OVA-spezifisch: Dieser ELISA wurde zur Auswertung des Erfolges einer Immunisierung mit Ovalbumin herangezogen. Für diesen Zweck wurde die ELISA-Mikrotiterplatte mit Ovalbumin (500 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten wie zuvor beschrieben ein Waschschrift, in dem überschüssiges Protein entfernt wurde, sowie ein zweistündiger Blockierschrift mit 1% BSA in PBS und erneutes Waschen. Danach konnten die auszutestenden Serumproben wie auch ein Standardserum aufgetragen werden. Dieses war zuvor durch Immunisierung von Wildtypmäusen und Mischen der entnommenen Seren gewonnen worden. Dabei wurden Verdünnungsstufen willkürlich ausgewählt und diese mit einer bestimmten Anzahl relativer Units gleichgesetzt, um die Auswertung der zu testenden Seren zu vereinheitlichen.

Nach einer Inkubationszeit von 2 h und erneutem Waschen wurde – je nach zu bestimmender Subklasse – biotinylierter anti-IgM-, anti-IgG1-, anti-IgG2a-, anti-IgG2b-, oder anti-IgG3-Antikörper (jeweils 1 µg/ml in 1% BSA/PBS) zugesetzt und anschließend wie oben beschrieben mit Streptavidin-gekoppeltem HRP und TMB One detektiert.

b) PPS-spezifisch: Dieser ELISA wurde eingesetzt, um diejenigen Antikörper relativ zu einem Standardserum zu bestimmen, deren Spezifität sich gegen das Pneumokokken-Polysaccharid Typ 19 richtet. Dieses wurde gewählt, da bekannt ist, dass für dieses Polysaccharid die Antwort in der Regel sehr stark ausfällt und somit die Detektion sehr leicht ist.

Zunächst wurde die ELISA-Mikrotiterplatte mit dem Polysaccharid Typ 19 (1µg/well in PBS) bei 4°C über Nacht beschichtet. Danach erfolgten wie gewohnt Wasch- und Blockierschritt. Währenddessen wurden die zu testenden Seren für 1 h bei RT mit Pneumokokken C Polysaccharid (CWPS) vorinkubiert. Dieser Schritt sollte zusätzlich vorab unspezifische Bindungen reduzieren.

Nach einer anschließenden zweistündigen Inkubation der Proben auf der Mikrotiterplatte wurde erneut gewaschen und dann entweder mit biotinyliertem anti-IgM- oder anti-IgG3-Antikörper die Detektion eingeleitet, die anschließend wie üblich mit Streptavidin-gekoppeltem HRP und TMB One Substrat erfolgte.

### **2.2.11. Intraperitoneale Injektion von LPS**

Für die Stimulation dendritischer Zellen wurden in mehreren Experimenten Mäuse mit dem TLR4-Liganden LPS vorbehandelt. Hierfür wurde das LPS in PBS gelöst zu einer Endkonzentration von 1 µg/µl und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurde die Lösung zunächst für 10 Minuten zur Zerstörung von Aggregaten im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend erfolgte die Injektion von 100 µl, entsprechend einer Dosis von 100 µg, intraperitoneal in den linken oder rechten Quadranten des Abdomens.

Nach 15 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Organe entnommen.

### **2.2.12. Intraperitoneale Injektion von 3-Methylcholanthren**

Bei 3-MC handelt es sich um eine polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffverbindung, welche als Ligand am Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) wirkt und diesen aktiviert.

Für die Behandlung von Versuchstieren wurde eine 10 mM-Stammlösung der Substanz in DMSO hergestellt. Diese wurde vor Gebrauch 1:100 in PBS verdünnt. Verabreicht wurden 200 µl dieser Lösung i.p. (entsprechend 20 nmol); Kontrolltiere erhielten ein ebenso großes Volumen 1%-iges DMSO/PBS. Die Organentnahme erfolgte 16 h nach Injektion.

### 2.2.13. Intraperitoneale Injektion von GalCer

Für die *in vivo*-Stimulation von NKT-Zellen wurde in mehreren Experimenten  $\alpha$ -Galactosylceramid (GalCer) verwendet. Hierfür wurde 1 mg der Substanz in 1 ml Pyridin zu 1 mg/ml gelöst. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:100 in PBS weiterverdünnt, so dass sich eine Konzentration von 10  $\mu$ g/ml in 1% Pyridin/PBS ergab. Diese Lösung wurde in Glasphiolen aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Falls nicht gesondert erwähnt, wurde den Versuchstieren eine Dosis von 200  $\mu$ l dieser Lösung, entsprechend einer Dosis von 2  $\mu$ g GalCer, intraperitoneal verabreicht.

Nach 24 h wurden die Mäuse getötet und die Organe entnommen.

Für einige Versuche wurde statt des kommerziell erwerbbaeren GalCer auch PBS-57 eingesetzt (Liu et al., 2006). Hierbei handelt es sich um ein ebenfalls synthetisch gewonnenes Glykolipid mit minimalen strukturellen Abweichungen von GalCer, welches von der Arbeitsgruppe von Paul B. Savage, Provo, Utah, zur Verfügung gestellt wurde. Dieses besitzt eine mit GalCer identische Aktivität auf NKT-Zellen, dabei jedoch eine leicht verbesserte Löslichkeit.

Die Substanz wurde zunächst in DMSO zu 1 mg/ml gelöst. Wie zuvor wurde auch diese Lösung 1:100 in PBS weiterverdünnt auf 10  $\mu$ g/ml in 1% DMSO/PBS und ebenso gelagert. Auch PBS-57 wurde intraperitoneal in Dosen von 2  $\mu$ g/Maus verabreicht und die Versuchstiere 24 h nach Injektion analysiert.

Kontrolltiere erhielten jeweils eine intraperitoneale Injektion von 200  $\mu$ l 1% Pyridin/PBS bzw. 1% DMSO/PBS.

### 2.2.14. Immunisierung mit OVA

Insgesamt wurden mehrere verschiedene Immunisierungsexperimente mit Ovalbumin durchgeführt, um den Einfluss der Immunisierungsrouten und der Ab- bzw. Anwesenheit von CCL17 in der Milz auf die T-Zell-abhängige humorale Immunantwort festzustellen.

Prinzipiell erfolgte an Tag 1 die Gabe einer 50  $\mu$ g-Initialdosis OVA sowie an Tag 15 ein Boost gleicher Dosis. Die Immunantwort der Versuchstiere wurde durch Blutentnahmen an Tag 0 (vor Behandlung), 9, 21 und 29 verfolgt.

In Abhängigkeit von der gewählten Immunisierungsrouten wurde die Formulierung des Antigens angepasst; so wurden bei i.p.-Administrierung beispielsweise pro Maus 100  $\mu$ l einer OVA-Lösung (500  $\mu$ g/ml) gemischt mit einem gleichen Volumen Alum als Adjuvans verabreicht. Für die i.v.-

Immunisierung wurden 200 µL einer OVA-Lösung (250 µg/ml) in PBS direkt in die Schwanzvene injiziert.

Um ausserdem die Folgen einer eventuellen CCL17-Expression in der Milz auf die Immunantwort zu untersuchen, wurde in einigen Experimentalgruppen an Tag 0 oder -2 eine Dosis von 2 µg α-GalCer i.p. (200 µl einer Lösung mit 10 µg/ml in PBS) verabreicht.

### **2.2.15. Immunisierung mit Pneumokokken-Polysaccharid**

Für die Immunisierung der Mäuse mit Pneumokokken-Polysaccharid wurde der humane Impfstoff Pneumovax® 23 verwendet. Dabei handelt es sich um eine Lösung, die die 23 häufigsten Pneumokokken-Serotypen 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F enthält.

Der Impfstoff wurde mit isotoner Natriumchlorid-Lösung so verdünnt, dass bei intravenöser Injektion von 250 µl der Lösung an Tag 0 jede Maus eine 1 µg-Dosis jedes Antigens erhielt. An Tag 28 erfolgte nochmal die Gabe einer Auffrischungsdosis. Zur Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Antikörperproduktion wurden an den Tagen 0, 5, 28, 33 und 56 Blutproben entnommen.

### **2.2.16. Blutentnahme**

Für die Blutentnahme an der lebenden Maus wurde die Methode der submandibulären Entnahme gewählt (Golde et al., 2005). Die jeweilige Maus wurde am Rücken gehalten und dann mit einer Kanüle die Wange in Höhe der retroorbitalen und submandibulären Venen punktiert. Nachdem ein Volumen von etwa 200-300 µl entnommen und mit einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen wurde, wurde die Maus zurück in den Käfig gesetzt und bis zur Blutungsstillung, die in der Regel unmittelbar erfolgte, beobachtet.

In Finalversuchen konnte das Blut durch Durchtrennung der Hohlvene (Vena cava) knapp unterhalb des Zwerchfells (Diaphragma) gewonnen und das in die Bauchhöhle austretende Blut mit einer Spritze aufgezogen werden.

Nach ausreichender Koagulationszeit (ca. 1h bei RT) konnten zelluläre Bestandteile des geronnenen Blutes abzentrifugiert und das Serum für spätere Untersuchungen (ELISA) bei -20°C eingefroren werden.

Für einige Experimente (z.B. Blutbildbestimmungen, FACS-Färbungen) war es erforderlich, dass keine Koagulation auftrat und die zellulären und/oder plasmatischen Bestandteile unverändert erhalten blieben. Hierfür wurden 9 Volumenanteile Blut unmittelbar bei der Entnahme mit 1 Teil 100 mM EDTA vermischt.

### 2.2.17. CASP-OP

Beim Colon ascendens stent peritonitis- bzw. CASP-Modell (Zantl et al., 1998) wird operativ ein septischer Focus in den Dickdarm gesetzt, der zu einer kontinuierlichen Einschwemmung von Bakterien aus dem Darmlumen in die Peritonealhöhle und in den systemischen Kreislauf führt. Die Methode stellt somit ein geeignetes Modell dar, die Pathophysiologie einer polymikrobiellen Sepsis nachzustellen.

Vor der Operation wurde ein Venenkatheter so präpariert, dass ein etwa 3 mm langes Stück von der Öffnungsseite her mit einem Skalpell kreisförmig so eingeschnitten wurde, dass nur eine kleine Verbindungsstelle stehenblieb. Die Maus wurde durch die Inhalation eines Gemisches aus Isofluran und Sauerstoff narkotisiert. Nach Desinfektion des Abdomens wurde dieses durch einen 1 cm langen mittigen Schnitt entlang der Linea alba eröffnet. Das Colon ascendens wurde exponiert, der präparierte Katheter durch die antimesenterische Wand, etwa 10 mm von der ileozökalen Klappe entfernt, in das Lumen des Colon ascendens eingebracht und mit zwei Stichen (7/0 Nylonfaden) fixiert. Danach wurde die Nadel aus dem Stent entfernt und dieser an der präparierten Schnittstelle abgeschnitten. Vorsichtig wurde Stuhl aus dem Zökum über das Colon ascendens in den Stent gedrückt, bis ein kleiner Tropfen Stuhl aus dem Stent austrat, der als initiale Injektionsdosis wirkte. Um den Flüssigkeitshaushalt der Tiere auszugleichen, wurde intraoperativ 0,5 ml sterile Kochsalzlösung in die Peritonealhöhle injiziert. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte im Bereich der Muskulatur mit einer fortlaufenden Nahttechnik (4/0 Nylonfaden).

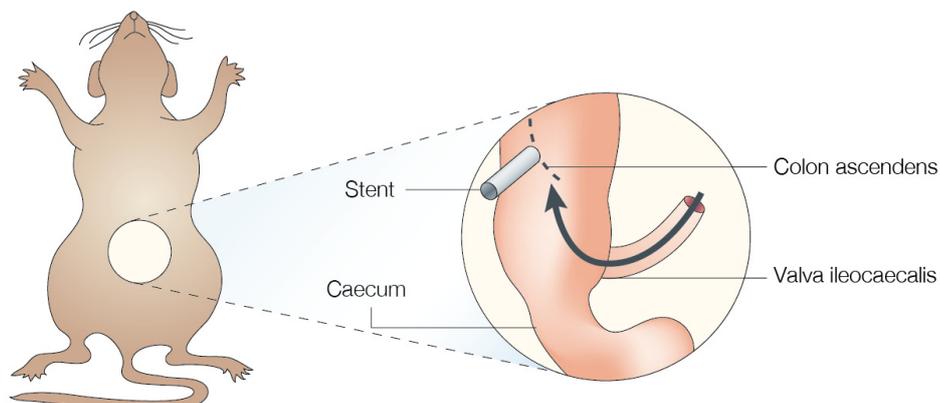


Abbildung 9: Schematische Darstellung der CASP-Methode. Modifiziert nach Buras et al., 2005.

### **2.2.18. In vivo-Zytotoxizitäts-Assay**

Dieser Assay dient zur Untersuchung der Fähigkeit eines Organismus, zytotoxische T-Lymphozyten zu bilden.

Zu diesem Zweck wurden an Tag 1 die Mäuse subkutan mit 300 µg OVA und 5 nmol CpG in PBS (50 µL) in die Schwanzwurzel immunisiert, wobei die Kontrollgruppe dieselbe Menge OVA in PBS, jedoch ohne Zusatz des Adjuvans erhielten.

An Tag 8 wurde eine Zellsuspension aus syngener Milz hergestellt. Diese wurde zunächst halbiert und die eine Hälfte der Zellen in 2 ml einer Lösung von Medium mit 1 µM SIINFEKL, einem im OVA-Protein enthaltenen Peptid, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Medium wurden die Zellen durch erneute Inkubation bei 37°C mit grünem Celltracker gefärbt, sowie die unbeladenen Zellen zur Unterscheidung mit rotem Celltracker (je 4 ml einer 8 µM bzw. 15 µM Lösung in Medium, 30 Minuten). Es folgte ein abschließender Waschschrift.

Abschließend erhielt jede der immunisierten Mäuse eine Menge von  $1 \times 10^7$  gefärbten Zellen (halb SIINFEKL-beladen, halb unbeladen) in einem Volumen von 200 µl PBS i.v. injiziert. Nach 4 Stunden wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen und zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. In diesen konnten mittels FACS-Analyse die zuvor injizierten Zellpopulationen aufgrund des Celltrackers wiedergefunden werden; hierbei gab das Verhältnis aus Peptid-beladenen und -unbeladenen Zellen Aufschluss über die Effizienz der Ausbildung von CTL.

### **2.2.19. Statistik**

Alle statistischen Tests wurden unter Verwendung der Software GraphPad Prism durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde von normalverteilten Daten ausgegangen und der *student's t-test* zur Berechnung der Signifikanz angewendet.

Im Falle der Serumtiter-Bestimmungen konnte dagegen keine Normalverteilung angenommen werden; dargestellt sind der Median sowie die Interquartilen. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test herangezogen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Unterschiedliche Genexpressionsmuster in DC der LK und der Milz

##### 3.1.1. Über 850 differentiell exprimierte Gene unterscheiden CCL17<sup>+</sup> LK- und CCL17<sup>-</sup> Milz-DC

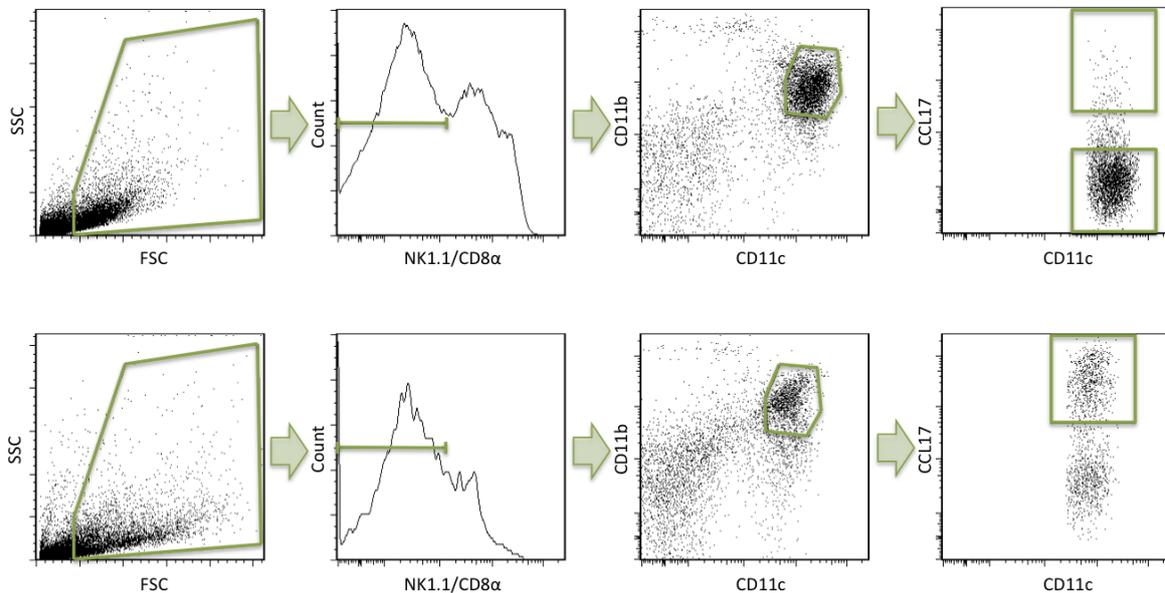
Mittels einer Genexpressionsanalyse unter Nutzung der Illumina-Technologie sollten die CCL17-produzierenden CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC der Lymphknoten mit Milz-DC des gleichen Phänotyps, die unter normalen Umständen keine CCL17-Produktion zeigen, miteinander verglichen werden. Ziel der Untersuchung war vorrangig die Klärung der Fragestellung, ob – zusammen mit CCL17 – weitere Gene differentiell reguliert werden und sich anhand dieser unterschiedliche Aufgaben und Funktionen der Zellen ableiten lassen.

Mittels LPS-Vorbehandlung sollte ein Angleichen des Aktivierungszustandes von Milz- und LK-DC aneinander erzielt werden, da unbehandelt in der Regel LK-DC, speziell die des Darms, eine höhere Aktivierung zeigen. Durch diese Behandlung exprimierte jedoch auch ein sehr geringer Prozentsatz Milz-DC CCL17, wodurch sich eine sekundäre Fragestellung ergab, ob diese Population hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils eher den CCL17-negativen Milz- oder den CCL17-positiven LK-DC ähnelt.

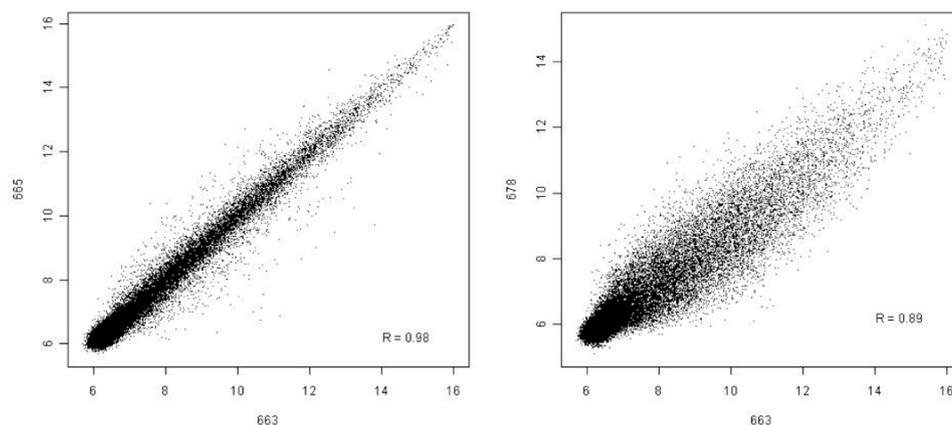
Insgesamt wurden in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Umwelthygiene in Düsseldorf vier unabhängige Experimente an CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen durchgeführt. Abb. 10 stellt die genaue Strategie dar, nach der die Zellen angereichert wurden. Zunächst wurden unter Einbeziehung der Parameter Größe und Granularität tote Zellen und Erythrozyten verworfen. Im nächsten Schritt wurden Zellen, die die Oberflächenmarker CD8 $\alpha$  und NK1.1 exprimierten, aussortiert. Damit sollten einerseits die CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC aus der Analyse ausgeschlossen werden, zum anderen eine Population von IKDC (Interferon-produzierende Killer-DC) (Chaput et al., 2006; Caminschi et al., 2007; Guimont-Desrochers et al., 2009; Terme et al., 2009). Diese Zellen produzieren im Gegensatz zu konventionellen DC große Mengen an IFN- $\gamma$  und exprimieren zusätzlich zu NK1.1 moderate Level an CD11c und MHC II, so dass ohne die zusätzliche Färbung eine Kontamination nicht hätte ausgeschlossen werden können. Die verbleibenden Zellen wurden weiterhin für CD11b- und CD11c-Expression selektiert, und schließlich aufgrund ihrer EGFP-Fluoreszenz in CCL17<sup>+</sup> und CCL17<sup>-</sup> DC unterschieden.

Die Reanalyse der sortierten Zellpopulationen zeigte dabei üblicherweise eine Reinheit von über 98%.

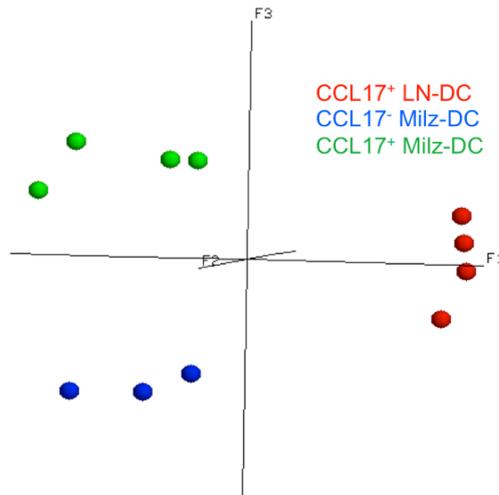
Anschließend wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Genomics und Immunregulation an der Universität Bonn die RNA isoliert und nach Qualitätskontrolle hybridisiert. Bei der nachfolgenden Analyse der Daten musste nachträglich eine der Proben CCL17-negativer Milz-DC aufgrund verminderter Qualität ausgeschlossen werden.



**Abbildung 10:** Zellsort-Strategie zur Isolierung CCL17-negativer Milz-DC (obere Reihe) bzw. CCL17-positiver LK-DC (untere Reihe). Die vorab mittels MACS-Technologie angereicherten DC wurden durch Ausschluss NK1.1- und CD8 $\alpha$ -exprimierender Zellen zunächst von NK-Zellen, IK-DC (Chaput et al., 2006; Caminschi et al., 2007) und CD8<sup>+</sup>-DC befreit. Durch Ausgrenzung CD11c- und CD11b-negativer Zellen wurde sichergestellt, dass es sich um DC der CD11b<sup>+</sup>-Subpopulation handelte. Zuletzt wurden in der Milz die wenigen durch LPS-Vorbehandlung CCL17-exprimierenden DC von den CCL17-negativen getrennt bzw. in der LK-Suspension die CCL17-negativen DC verworfen.



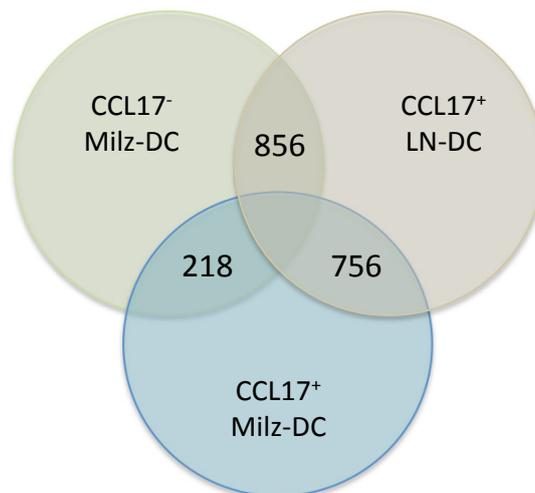
**Abbildung 11:** Beurteilung der RNA-Probenqualität anhand von Scatterplots. Die Scatterplots stellen eine graphische Auftragung beobachteter Wertepaare zweier Datensätze dar. Dabei kann eine geringe Korrelation zwischen Datensätzen einer Gruppe auf eine verminderte Probenqualität hinweisen. In diesem Beispiel zeigt der rechte Scatterplot, in dem die Datensätze zweier CCL17-negativer Milz-DC-Proben aufgetragen sind, einen sehr geringen Korrelationskoeffizienten. Eine der beiden Proben (678) wurde später aufgrund schlechter Qualität ausgeschlossen.



**Abbildung 12:** Principle Component Analysis der Datensätze. Die PCA reduziert die Dimensionalität der Daten des Arrays auf ein dreidimensionales Koordinatensystem. Die Ähnlichkeit der verschiedenen Datensätze kann so mit einem Blick abgelesen werden.

Interessanterweise zeigte der direkte Vergleich der CCL17<sup>+</sup> LK-DC mit den CCL17<sup>-</sup> Milz-DC über 800 differentiell regulierte Gene, die mindestens um den Faktor 2 in einer der beiden Populationen über- bzw. unterrepräsentiert waren. Diese unerwartet große Zahl für Zellen identischer Oberflächenmarker legt bereits nahe, dass starke Unterschiede in der Funktionalität der beiden DC-Populationen bestehen müssen.

Vergleichsweise ähnlich stark abweichend voneinander sind die Genexpressionsprofile von CCL17<sup>+</sup> LK-DC und CCL17<sup>+</sup> Milz-DC, während CCL17<sup>+</sup> und CCL17<sup>-</sup> Milz-DC sich nur in etwas über 200 differentiell exprimierten Genen unterscheiden.



**Abbildung 13:** Vergleich der Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen den CCL17<sup>+</sup> LK-DC, CCL17<sup>+</sup> Milz-DC sowie CCL17<sup>-</sup> Milz-DC

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Verwandtschaft zwischen beiden Gruppen von Milz-DC trotz divergierender CCL17-Produktion enger sein muss als zwischen Milz- und LK-DC, da diese beiden Gruppen sich selbst bei gleichem CCL17-Muster noch sehr stark unterscheiden.

Da primäres Ziel der vorgenommenen Genexpressionsanalyse der Vergleich der CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CCL17-exprimierenden LK-DC und der CCL17-negativen Milz-DC gleichen Phänotyps war, fokussiert sich die weiterfolgende Auswertung auf die Teildatenmenge der zwischen den CCL17<sup>+</sup> LK-DC und CCL17<sup>-</sup> Milz-DC differentiell regulierten Gene. In den folgenden Untersuchungen ist also, wenn von untersuchten Milz-DC die Rede ist, immer die Population der CCL17<sup>-</sup> Milz-DC gemeint.

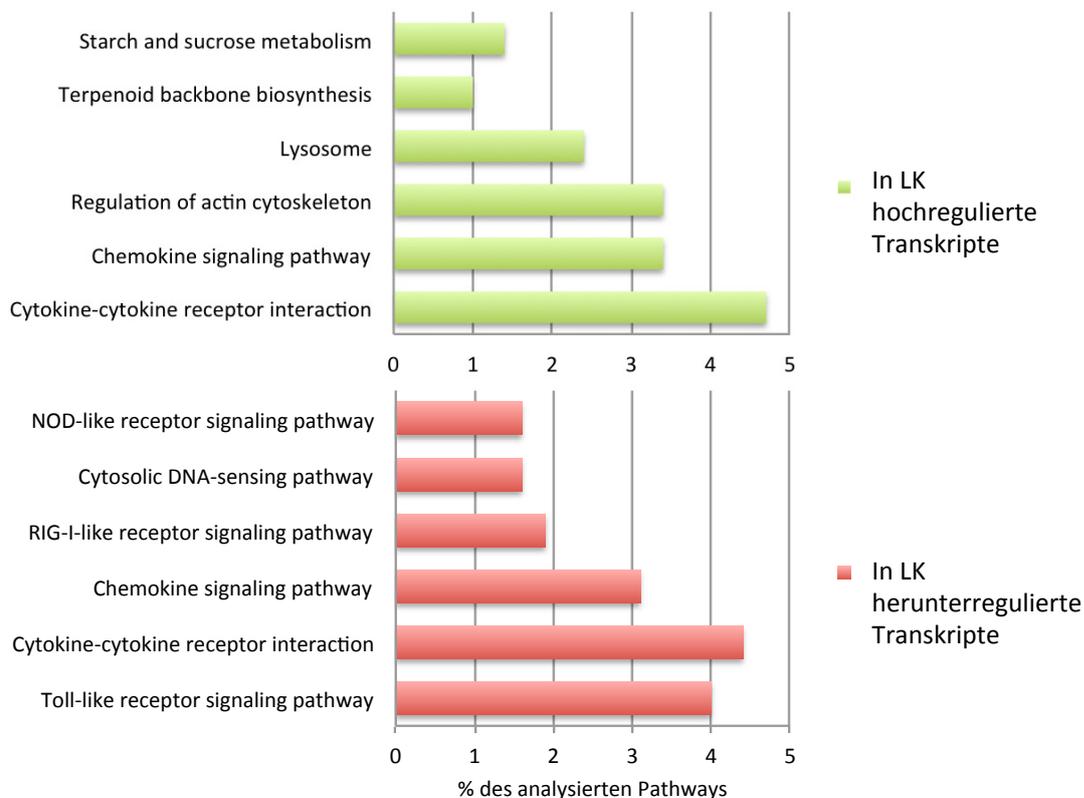
Tabelle 1 zeigt exemplarisch die jeweils fünfzig am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte, bezogen auf die LK-DC:

**Tabelle 1: Auflistung der am stärksten differentiell regulierten Gene (unter Auslassung von unbekanntem und RIKEN-Genen.) Der  $\Delta$ -Wert gibt an, wievielfach mehr bzw. weniger ein Gen in CCL17<sup>+</sup> LK-DC verglichen mit CCL17<sup>-</sup> Milz-DC exprimiert ist. Eine vollständige Liste aller Daten befindet sich im Anhang.**

Gen	$\Delta$	Gen	$\Delta$	Gen	$\Delta$	Gen	$\Delta$
Cxcl10	-18	Spic	-4,52	Slc25a29	3,58	Mylk	4,85
Ccl4	-13,93	Tbx21	-4,51	Sqle	3,61	Scn4b	4,96
Tgm2	-7,03	Enpp2	-4,44	Thy1	3,69	Mras	5,06
Ccl4	-6,74	Ifit2	-4,44	Ccdc120	3,72	Tmem86a	5,21
Cxcl9	-6,72	Cmpk2	-4,37	Hopx	3,77	Cyp7b1	5,31
Ube2e2	-6,72	Mx2	-4,33	Tpm2	3,79	St5	5,42
Tagap	-6,69	Il1r2	-4,3	Dvl1	3,82	Fnbp1	5,43
Adam11	-6,36	Kif23	-4,3	Gfer	3,83	Lyz2	5,48
Ryr3	-6,25	Cd86	-4,29	Stap2	3,96	Lima1	5,95
Upp1	-6,23	Sct	-4,14	Mospd1	3,97	Sema6d	5,95
Spic	-6,11	Gadd45g	-4,07	Zmynd15	3,98	Net1	6,02
Gpr18	-5,94	Fcgr4	-4,06	Rhoc	4,07	Osbpl3	6,35
Isg20	-5,87	Upp1	-4	Extl1	4,19	Stra6	6,46
Dtx1	-5,65	Adrb2	-3,94	Nans	4,21	Slc22a4	6,58
Nod1	-5,64	Ifi44	-3,9	Srxn1	4,25	Fndc5	6,7
Tlr7	-5,5	Ptpro	-3,88	Pltp	4,26	Arc	7,09
Lag3	-5,29	Ccl3	-3,85	Rhof	4,28	Sult1a1	7,2
Vps37b	-5,25	Lrp8	-3,83	Dnahc2	4,3	Car2	7,6
Oas2	-5,23	Pira6	-3,82	Lad1	4,31	Apol7c	7,75
Pstpip1	-5,09	Pml	-3,81	Gsto1	4,33	Apol10b	7,95
Sema4f	-5,05	Tpst2	-3,78	Pygl	4,35	Lyz1	8,07
Egr1	-4,96	Cxcr5	-3,77	Csf2rb	4,39	Ccl22	9,21
Ly6a	-4,89	E2f2	-3,75	Ahrr	4,47	Slc9a3r2	11,49
Lrrc33	-4,8	Neurl	-3,73	Cgnl1	4,56	Itgae	13,14
Igtp	-4,8	Ifi47	-3,72	Pcbp4	4,56	Syng3	13,86
Soat2	-4,77	Nupr1	-3,72	F11r	4,57	Aldh1a2	14,19
Tpst1	-4,75	Nrap	-3,71	Palld	4,61	Ppp1r1a	15,64
Ifit3	-4,73	Parp9	-3,67	Eno3	4,73	Clu	19,28
Hbb-b1	-4,65	Cyp4f16	-3,6	Cdh26	4,81	Aqp9	19,7
Ier3	-4,65	Flot1	-3,6	Mmp23	4,85	Ccl17	44,41

Bei Betrachtung der Arraydaten fallen bereits einige interessante Daten auf, die auf möglicherweise unterschiedliche Funktionen der untersuchten Zellpopulationen hindeuten könnten. Für eine tiefere und automatisierte Analyse dieser Art Datensätze stehen jedoch zusätzlich die Online-Datenbanken Gene Ontology und KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) im Internet zur Verfügung, die Genen ihre jeweiligen bestimmten biologischen Prozesse, molekularen Funktionen und zellulären Komponenten zuordnen (Ashburner et al., 2000; Kanehisa and Goto, 2000; Huang et al., 2009). Dabei erfolgt die Einteilung hierarchisch und zunächst sehr allgemein, mit jeder weiteren Ebene jedoch spezifischer (z.B. Biological process  $\leftarrow$  Response to stimulus  $\leftarrow$  Immune response). Auf diese Datenbanken greifen verschiedene frei zugängliche Internetseiten zu, die einen Abgleich eigener Genlisten mit diesen Datenbanken ermöglichen und biologisch relevante Häufungen von Genen bestimmter Zugehörigkeit anhand der GO- bzw. KEGG-Kategorisierungen aufdecken.

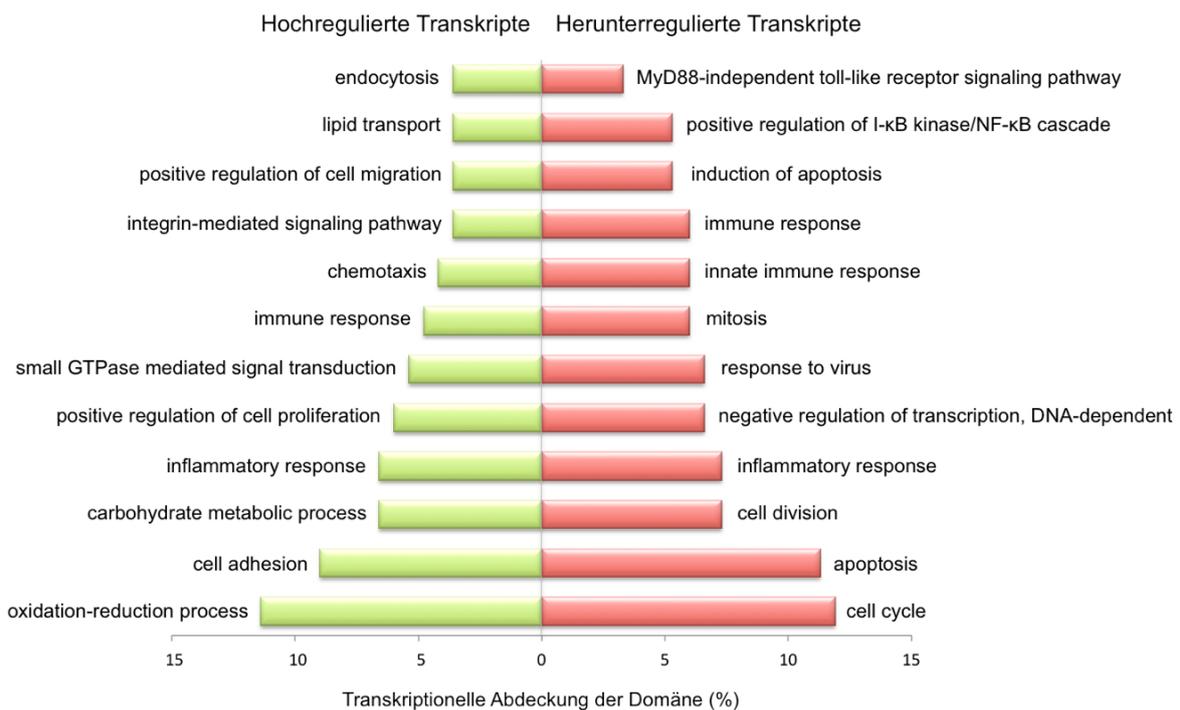
So wurden unter anderem DAVID Bioinformatics Resources, eine Datenbank des NIH (National Institute of Health), und FunNet, eine Plattform des INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) für die Analyse herangezogen und mit diesen Tools die differentiell exprimierten Gene allen mit Hilfe des Array untersuchten Genen bzw. dem vollständigen murinen Genoms gegenübergestellt (Prifti et al., 2008; Huang et al., 2009).



**Abbildung 14:** Ergebnisse der DAVID-Analyse. Mit dem Online-Analysetool DAVID wurden die über- bzw. unterrepräsentierten Gene einer funktionellen Zuordnung unterzogen. Abgebildet sind einige Häufungen auftretender Gene in den KEGG-Kategorien; dabei sind in grün die in den LK-DC hochregulierten Transkripte und in rot die in den LK-DC herunterregulierten, also in den Milz-DC überrepräsentierten Transkripte dargestellt.

Auf der Basis der Auswertung mit der Plattform DAVID finden sich funktionelle Häufungen der regulierten Gene vor allem in den KEGG-Kategorien „Cytokine – cytokine receptor interaction“ und „Toll-like receptor signaling pathway“, sowie in den GO-Kategorien „Immune response“, „Defense response“, „Response to wounding“ und vielen anderen. Abb. 14 stellt einige gefundene Häufungen sowie ihre prozentualen Anteile an den für den jeweiligen Signalweg annotierten Genen dar.

Die Analyse mittels FunNet kommt zu weitestgehend ähnlichen Ergebnissen. Ein Teilergebnis der GO-Analyse biologischer Prozesse ist in Abb. 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Resultate der FunNet-Analyse.** Die funktionelle Datensatz-Analyse auf Häufungen innerhalb biologischer Prozesse mit der Plattform FunNet zeigte ähnliche Ergebnisse wie die DAVID-Analyse. In grün dargestellt sind die in den LK-DC herunterregulierten, in rot die dort hochregulierten Transkripte dargestellt.

Als Fazit der internetbasierten Analyse der Genexpression lässt sich festhalten, dass sich die Milz- und LK-DC in der Transkription vieler vor allem immunologisch relevanter Gene unterscheiden. Vor allem im Bereich des Zytokin- und Chemokin-Signalings sowie der Mustererkennung finden sich zahlreiche Unterschiede.

### 3.1.2. Milz-DC und LK-DC unterscheiden sich in ihrem Chemokin-Profil

Da die Online-Analyse der Arraydaten immer wieder auf die als dem Chemokin-Signalweg zugehörig annotierten Gene hinwies, sind in Tab. 2 nochmal alle differentiell transkribierten Chemokine sowie -Rezeptoren zusammengefasst.

Tabelle 2: Liste aller differentiell exprimierten Chemokine und Chemokin-Rezeptoren.

Gen	Name	Alternativer Name	$\Delta$
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10)	-18
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	MIP-1 $\beta$ (Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ )	-13,93
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	MIG (Monokine induced by gamma interferon)	-6,72
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	MIP-1 $\alpha$ (Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ )	-3,85
Cxcr5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	BLR1 (Burkitt lymphoma receptor 1)	-3,77
Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	HCR, CKRX, CRAM, CRAM-A, CRAM-B	-3,48
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	CD195	-2,62
Ccr6	chemokine (C-C motif) receptor 6	CD196	-2,2
Darc	Duffy blood group, chemokine receptor	CD234, Fy glycoprotein (FY)	-2,06
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Gro- $\alpha$ , GRO1, NAP-3, KC (keratinocyte-derived chemokine)	2,78
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	BLC (B lymphocyte chemoattractant)	3,19
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	SRPSOX	3,19
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	MIP-2 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein 2 $\alpha$ )	3,42
Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Fraktalkine	3,49
Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	MDC (macrophage-derived chemokine)	9,21
Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	TARC (thymus and activation regulated chemokine)	44,41

Die drei in den LK-DC am stärksten überexprimierten Gene sind die sich auf dem murinen Chromosom 8q befindenden Chemokine CCL17, CCL22 und CX3CL1; davon werden die ersten beiden in der Regel eher mit T<sub>H</sub>2- als mit T<sub>H</sub>1-Reaktionen assoziiert (Nakayama et al., 2004; Tsunemi et al., 2006). Dagegen sind mit CXCL10, CCL4, CXCL9 und CCL3 vier Chemokine, die T<sub>H</sub>1-Immunantworten begünstigen, in den Milz-DC stark überrepräsentiert (Luther and Cyster, 2001; Whiting et al., 2004; Lebre et al., 2005; Vasquez et al., 2008).

Das Ergebnis legt nahe, dass die beiden untersuchten DC-Populationen trotz ihrer Ähnlichkeit hinsichtlich zellulärer Marker unterschiedliche Funktionen besitzen und LK-DC eher T<sub>H</sub>2-, und Milz-DC eher T<sub>H</sub>1-Reaktionen favorisieren.

### 3.1.3. Erhöhte Anreicherung IFN- $\gamma$ -assoziierter Gene in Milz-DC

Bei Betrachtung der Gene, die in dem Illumina-Array als differentiell reguliert in Erscheinung traten, fiel weiterhin eine Häufung derjenigen Gene auf, die entweder durch IFN- $\gamma$  reguliert werden oder auf andere Weise mit der IFN- $\gamma$ -Signalkaskade in Zusammenhang stehen. Listet man alle dieser Gene auf, fällt ein Missverhältnis dieser zugunsten der Milz auf, d.h. die DC dort exprimieren diese Gene in einem verstärkten Maße verglichen mit den LK-DC (Abb. 16). Unter diese Gruppe fallen zahlreiche Interferon-induzierbare Proteine und GTPasen, mehrere Chemokine, die zugunsten einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort polarisieren (Loetscher et al., 2001), und das Gen für die ligandenbindende Untereinheit des IFN- $\gamma$ -Rezeptors (IFN $\gamma$ R), *Ifngr1* (CD119).

Das Letztgenannte war für diese Arbeit von besonderem Interesse, da dieser Rezeptor bekanntermaßen auf nahezu allen Zelltypen, ausgenommen reifen Erythrozyten, exprimiert wird

(Farrar and Schreiber, 1993). Zusammen mit der eingangs beschriebenen supprimierenden Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die CCL17-Produktion in murinen Langerhans-Zellen (Xiao et al., 2003a) ergibt sich die noch zu überprüfende Hypothese, dass die LK-DC möglicherweise diese Suppression durch Rezeptor-Herunterregulation umgehen.

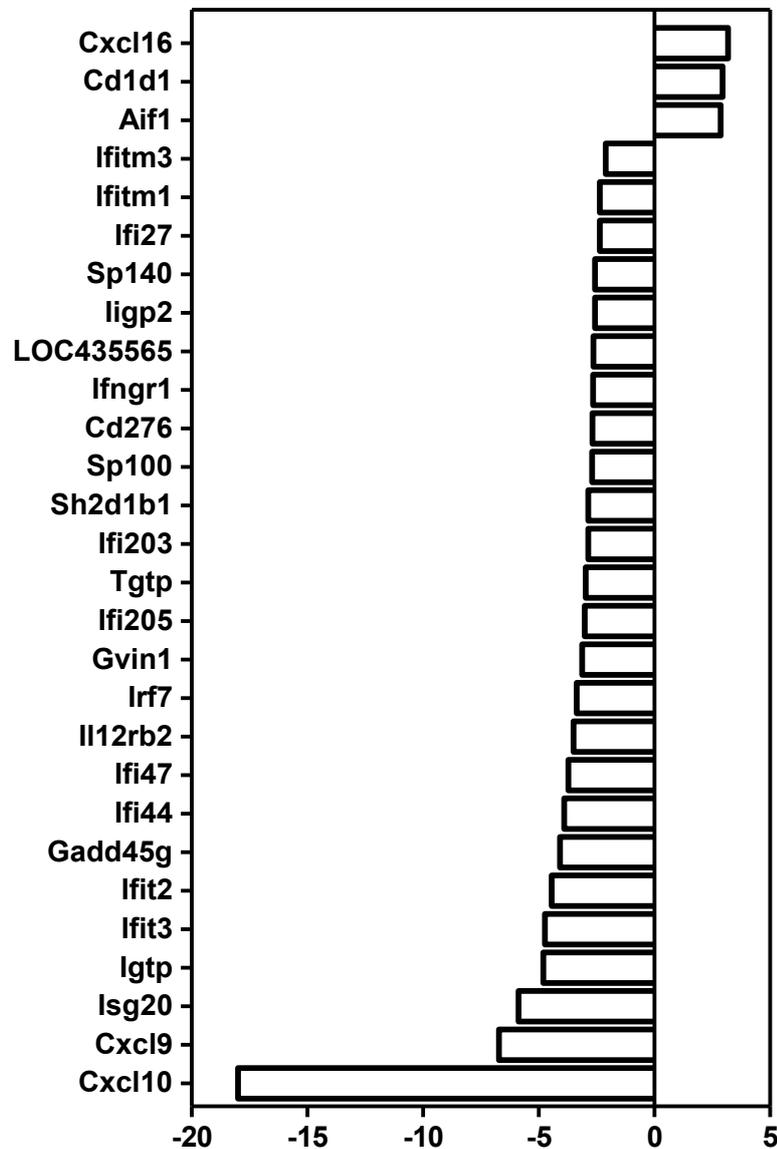


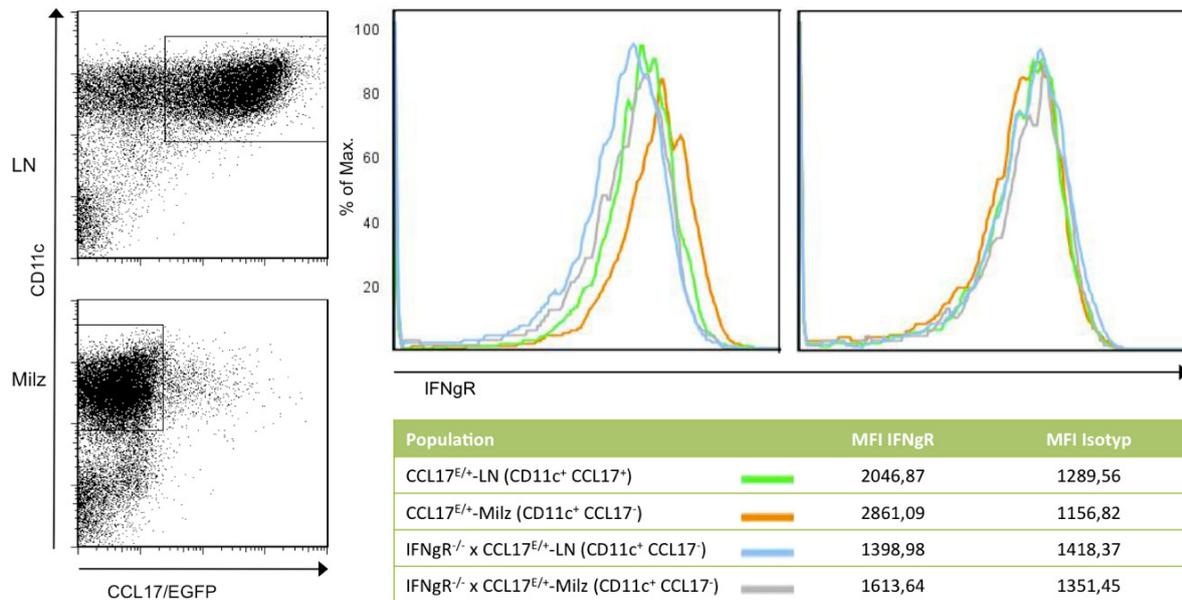
Abbildung 16: Auflistung aller differentiell exprimierten IFN- $\gamma$ -assoziierten Gene (Cxcl10, chemokine ligand 10; Cxcl9, chemokine ligand 9; Isg20, interferon-stimulated protein; Igtp, interferon gamma-induced GTPase; Ifit3, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3; Ifit2, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2; Gadd45g, growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma; Ifi44, interferon-induced protein 44; Ifi47, interferon gamma inducible protein 47; Il12rb2, Interleukin 12 receptor beta 2; Irf7, Interferon regulatory factor 7; Gvin1, GTPase, very large interferon inducible 1; Ifi205, interferon activated gene 205; Tgtp, T-cell specific GTPase; Ifi203, interferon activated gene 203; Sh2d1b1, SH2 domain protein 1B1; Sp100, nuclear antigen Sp100; Cd276, CD276 antigen; Ifngr1, interferon gamma receptor 1; LOC435565, interferon-inducible GTPase-like; ligp2, interferon inducible GTPase 2; Sp140, Sp140 nuclear body protein; Ifi27, interferon, alpha-inducible protein 27; Ifitm1, interferon induced transmembrane protein 1; Ifitm3, interferon induced transmembrane protein 3; Aif1, allograft inflammatory factor 1; CD1d1, CD1d1 antigen; Cxcl16, chemokine ligand 16)

### 3.1.4. LK-DC regulieren den IFNgR herunter

Die im Array aufgetretene differentielle Regulation des IFNgR zwischen zwei nahe miteinander verwandten Zellpopulationen erschien aufgrund der angesprochenen ubiquitären Expression dieses Rezeptors auffällig und sollte näher untersucht werden. Das Gen für den IFNgR, *Ifngr1*, lag bei dem Array um den Faktor -2,64 verändert vor, d.h. es war 2,64-mal stärker in der Milz als in den LK transkribiert. Um zu überprüfen, ob sich die verstärkte Transkription auch auf Protein-Ebene wiederfindet, wurde durchflusszytometrisch die Expression des IFNgR untersucht. Dabei wurden jeweils die Zellen betrachtet, die auch zuvor für den Array sortiert worden waren, nämlich die CCL17-produzierenden DC in den Lymphknoten sowie die CCL17-negativen Milz-DC.

Wie in Abb. 17 zu sehen, zeigen sowohl die Färbung für den IFNgR als auch eine entsprechende Isotypkontrolle eine hohe unspezifische Autofluoreszenz. Daher wurden zum Vergleich Organe IFNgR-defizienter Tiere mit analysiert. Man kann erkennen, dass sich die untersuchten Populationen im Histogramm nur schwach unterscheiden, was jedoch ein generelles Problem dieser Färbung ist und anderen Literaturdaten entspricht (Rayamajhi et al., 2010). Es ergeben sich jedoch Unterschiede in der Expressionsdichte, die sich am Besten anhand der dargestellten medianen Fluoreszenzintensität quantifizieren lassen. Während die Milz-DC mit einer MFI von 2861 den Rezeptor offensichtlich am stärksten exprimieren, weisen die CCL17-positiven LK-DC dagegen eine geringere Signalstärke auf (MFI von 2047) und liegen damit wesentlich dichter bei den Milz- sowie LK-DC der IFNgR<sup>-/-</sup>-Mäuse. Dagegen sind bei der Isotypfärbung keine derartigen Schwankungen in der MFI zu finden, und auch die Histogramme der jeweiligen Populationen überlagern sich nahezu. Somit konnte das Ergebnis aus dem Array bestätigt werden; es findet tatsächlich auch auf Proteinebene eine Rezeptor-Herunterregulation statt.

Diese Tatsache legt wie auch die vorangehenden Daten nahe, dass IFN- $\gamma$  sowie sein Rezeptor an der Regulation von CCL17 in der Milz beteiligt ist.

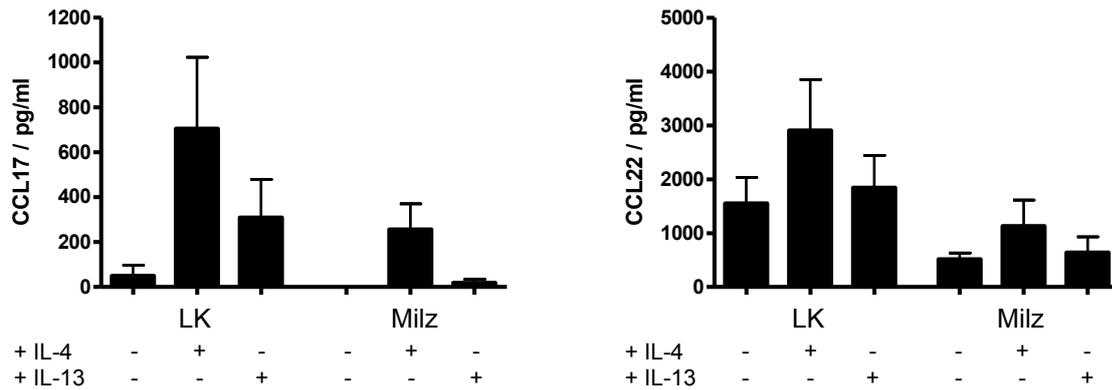


**Abbildung 17:** Vergleich der Expression des Rezeptors für IFN- $\gamma$  zwischen Milz- und LK-DC. Die Dot Plots links zeigen beispielhaft die Gating-Strategie, nach der die angereicherten DC auf die Expression vom IFN $\gamma$  untersucht wurden. In den LK wurden die CCL17-positiven Zellen ausgewählt, in der Milz die CCL17-negativen. Das linke Histogramm zeigt den Overlay der beiden zu analysierenden Populationen sowie IFN $\gamma$ -defizienter Kontrollen im Hinblick auf ihre IFN $\gamma$ -Signalstärke. Das rechte Histogramm zeigt die Fluoreszenz einer entsprechenden Isotypkontrolle. Tabellarisch zusammengefasst (unten) wurde zusätzlich die jeweilige Median Fluorescence Intensity.

### 3.1.5. Differentielle Expression von CCL22 zwischen LK- und Milz-DC

Da die Ergebnisse der Transkriptomanalyse auf eine differentielle Expression des mit CCL17 nahe verwandten Chemokins CCL22 hinwiesen, sollte dieses Ergebnis auf Proteinebene bestätigt werden. Laut Arraydaten lag die mRNA für *Ccl22* in den LK um den Faktor 9,21 stärker repräsentiert vor; somit gehört *Ccl22* mit zu den am stärksten regulierten Genen. In der Literatur war bereits im Jahr 2005 durch Fujita et al. im Vergleich muriner Langerhans-Zellen (LC) mit Milz-DC eine Diskrepanz hinsichtlich einer verminderten Expression von CCL17 und CCL22 in der Milz aufgefallen (Fujita et al., 2005).

Daher wurden DC aus beiden Organen mittels MACS angereichert und teilweise unter Einsatz von IL-4 bzw. IL-13 kultiviert.



**Abbildung 18:** Vergleich der CCL17- und CCL22-Produktion zwischen Milz- und LK-DC. Für die Untersuchung der Chemokin-Produktion in LK- sowie Milz-DC wurden CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse mit 100 µg LPS i.p. vorbehandelt. Nach 15 h wurden Milzen und LK entnommen und DC mittels MACS angereichert. Die Säulendiagramme zeigen die durch ELISA ermittelten Proteinspiegel für CCL22 (rechts) und zum Vergleich CCL17 (links) in Kulturüberständen angereicherter DC nach 24-stündiger Inkubation (n = 3 Experimente).

Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, liegt für die beiden untersuchten Chemokine ein ähnliches Expressionsmuster vor. Sowohl CCL17 als auch CCL22 werden von LK-DC stärker produziert als von Milz-DC. Beide Chemokine zeigen eine gute Induzierbarkeit durch IL-4 und eine sehr viel schwächere durch IL-13. Betrachtet man die absolut sezernierten Mengen, fällt auf, dass weit höhere Mengen CCL22 produziert werden als CCL17.

Zusammenfassend lassen sich die ermittelten Daten bestätigen; CCL22 scheint tatsächlich ebenfalls milzspezifisch supprimiert zu sein.

### 3.1.6. Analyse der Korrelation der CCL17- und AhRR-Expression in der Milz

Bei einem weiteren Gen, das als 4,47-fach stärker in den LK- als in den Milz-DC transkribiert identifiziert wurde, handelt es sich um den Arylhydrocarbonrezeptor-Repressor, AhRR, einen negativen Regulator des AhR. Dessen Expressionsmuster wurde in unserer Arbeitsgruppe näher untersucht und zeigt Parallelen zu CCL17. AhRR ist unter normalen Bedingungen nicht in der Milz exprimiert, dagegen findet man eine relativ starke Expression in DC des Darms. Der AhRR zeigt häufig eine Induzierbarkeit durch TLR-Liganden, die jedoch in der Milz nicht gefunden wurde.

Der polycyclische aromatische Kohlenwasserstoff 3-Methylcholanthren (3-MC) ist ein Ligand des AhR (Naruse et al., 2002). Bei Ligandenbindung und daraus resultierender Aktivierung kommt es zelltypabhängig zu einer Induktion AhR-abhängiger Gene, darunter auch des AhRR. Da gruppenintern gezeigt wurde, dass diese Stimulation ebenfalls in der Milz zur Hochregulation des AhRR führt, sollte durch Behandlung mit 3-MC überprüft werden, ob die verminderte Expression von AhRR und CCL17

in der Milz möglicherweise zusammenhängt und somit CCL17 zu der Gruppe der AhR-induzierbaren Gene gehört.

Aus dem Experiment geht hervor, dass in der Milz kein signifikanter Anstieg CCL17-exprimierender Zellen durch die 3MC-Behandlung und AhR-Stimulation hervorgerufen wird. Als weiterführendes Experiment könnte jedoch noch überprüft werden, ob eine bessere Induzierbarkeit in IFN $\gamma$ -defizienten Tieren gegeben ist.

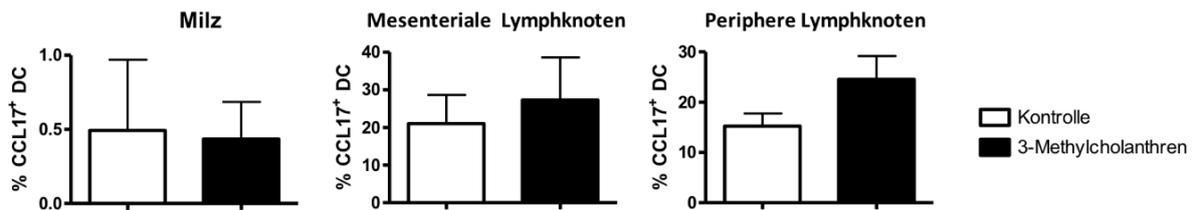


Abbildung 19: Keine Korrelation zwischen der CCL17- und AhRR-Expression in der Milz. CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse erhielten einmalig eine i.p.-Injektion von 20 nmol 3-MC in PBS. Nach 16 h wurden Milzen und LK entnommen und mittels FACS-Analyse auf die Expression von CCL17/EGFP untersucht. Die Säulendiagramme zeigen den Anteil CCL17-positiver DC an der Gesamt-DC-Population (n = 3-4 Mäuse/Gruppe).

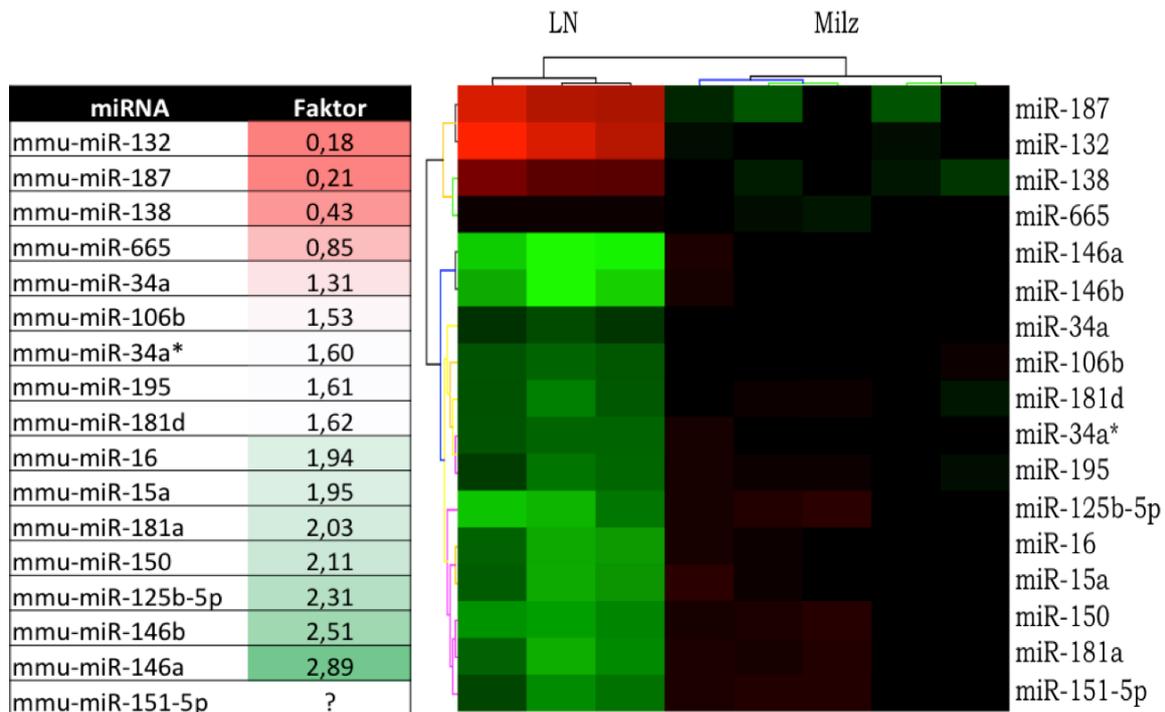
### 3.1.7. Alternierende Expression von 17 miRNA zwischen DC der LK und der Milz

Aufgrund der Ergebnisse der genomweiten mRNA-Expressionsanalyse (siehe Abschnitt 3.1.1.) stellte sich die Frage, ob die große Anzahl differentiell exprimierter Gene möglicherweise zurückgeführt werden konnte auf eine oder wenige ursächliche miRNA, die die so unterschiedliche Programmierung der Zellpopulationen bewirken.

So wurden zusätzlich fünf weitere Sort-Experimente zur Gewinnung CCL17-positiver LK-DC und -negativer Milz-DC durchgeführt, die hinsichtlich der Durchführung identisch mit denen in Abschnitt 3.1.1. waren. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten wurde bei der Isolation der RNA die Fraktion der miRNA jedoch mit extrahiert. Bei der Firma Exiqon wurde eine Analyse der miRNA-Fraktion in Auftrag gegeben, welche nach Ausschluss zweier LK-Proben aufgrund beeinträchtigter Qualität 17 unterschiedlich stark exprimierte miRNAs ans Licht brachte (Tab. 3). Diese Zahl erscheint im ersten Augenblick vergleichsweise klein im Gegensatz zur mRNA-Analyse. Bezieht man jedoch mittels der Internetplattform Targetscan (Friedman et al., 2009) die Gene mit ein, an deren Regulation die differentiell transkribierten miRNA beteiligt sein können, resultieren daraus viele hundert Möglichkeiten. Von den so gefundenen potentiellen Targets tauchen wiederum fast 200 Gene in dem

zuvor durchgeführten Array als unterschiedlich exprimiert auf. Somit ist äusserst wahrscheinlich, dass an der Regulation dieser Gene eine oder mehrere der gefundenen miRNA beteiligt sind.

**Tabelle 3: Auflistung aller gefundenen, differentiell zwischen LK- und Milz-DC exprimierten miRNAs. Eine Zuordnung der miRNA zu ihren potentiellen Targets befindet sich im Anhang.(Die mit „?“ gekennzeichnete miRNA wurde in der von der Firma Exiqon vorgenommenen Auswertung nicht berücksichtigt.)**



Die miR-146-Familie wird in der Literatur z.B. in einen Kontext gebracht mit der Regulation von TLR- und Zytokin-Signalkaskaden; sie wird NF- $\kappa$ B-abhängig durch LPS hochreguliert, moduliert die Expression von TRAF6 und IRAK1 und verhindert somit eine überschießende Signaltransduktion (Taganov and al, 2006; Rusca and Monticelli, 2011). Ein Verlust des miR-146a-Genes zieht sowohl eine Hyperresponsivität nach LPS wie auch Autoreaktivität bis hin zu Krebs nach sich (Boldin et al., 2011).

miR-132 gehört ebenfalls zu den LPS-sensitiven miRNAs und scheint zudem an der Regulation des transkriptionellen Coaktivators p300 beteiligt zu sein (Taganov and al, 2006; Lagos et al., 2010). Im Fall verschiedener Virusinfektionen wurde nachgewiesen, dass die Hochregulation von miRNA-132 einen negativen Effekt auf die Expression verschiedener IFN-abhängiger Gene hatte. Übereinstimmend damit ist miRNA-132 in den Milz-DC, die eine verstärkte Transkription IFN- $\gamma$ -abhängiger Gene zeigen, unterrepräsentiert; zudem sind Ifit2 und Gvin1 (s. Abb. 15) laut Targetscan mögliche Zielgene.

Dagegen wird miR-125b in einer Publikation als Antwort auf eine LPS-Stimulation herunterreguliert und inhibiert in Konsequenz das TNF $\alpha$ -Signaling (Tili et al., 2007).

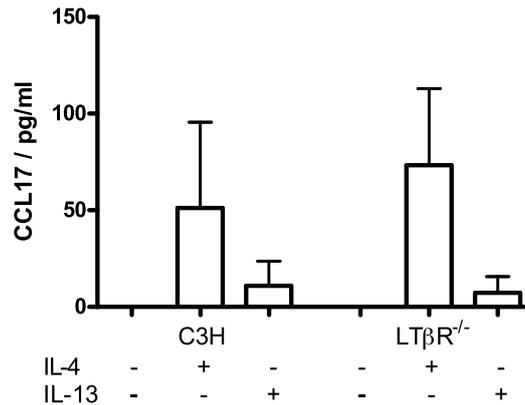
Diese Daten bieten verschiedene potentielle Targets, die in weiterführenden Experimenten beispielsweise mit anti-miRNAs inhibiert werden könnten, um die Auswirkung dieser Genregulation zu untersuchen.

## **3.2. Regulation von CCL17 in Milz-DC**

### **3.2.1. Suppression von CCL17 zeigt keine Abhängigkeit vom LT $\beta$ R**

Bei dem Rezeptor für Lymphotoxin  $\beta$  handelt es sich um ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, welches eine essentielle Rolle in der Genese sekundärer lymphatischer Organe besitzt (De Togni et al., 1994; Rennert et al., 1998). LT $\beta$ R-defiziente Mäuse bilden keinerlei Lymphknoten oder Peyer'schen Plaques aus und zeigen innerhalb der Milz keine wahrnehmbare Trennung zwischen T- und B-Zell-Zonen (Fütterer et al., 1998). Der Rezeptor, der beispielsweise von Stromazellen, nicht aber von B- oder T-Lymphozyten exprimiert wird, kontrolliert dabei NF- $\kappa$ B-abhängig die Level der Chemokine CXCL13, CCL19 und CCL21 (Ngo et al., 1999; Dejardin et al., 2002).

Um zu überprüfen, ob LT $\beta$ R<sup>-/-</sup>-defiziente Milz-DC in der Lage sind, CCL17 zu sezernieren, und ob somit ein Zusammenhang zwischen Integrität der Milzarchitektur und CCL17-Suppression gegeben ist, wurden LT $\beta$ R<sup>-/-</sup>-Mäuse auf C3HeB/FeJ-Hintergrund sowie passende WT-Kontrollen durch Gabe von LPS vorbehandelt. Nach 15 h wurden Milz-DC isoliert, zusätzlich durch Zytokine stimuliert, und nach 24 h Kultivierung CCL17 in den Überständen gemessen.



**Abbildung 20:** Untersuchung der CCL17-Produktion von LTβR-defizienten DC. LTβR<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie passende C3H-WT-Kontrollen wurden durch eine einmalige Injektion von 100 µg LPS i.p. vorbehandelt. 15 h später wurden die Milzen entnommen, eine Anreicherung der DC mittels MACS durchgeführt und diese für 24 h, gegebenenfalls unter Zusatz von IL-4 oder IL-13, in Kultur genommen. Das Diagramm zeigt die in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessenen CCL17-Spiegel.

Wie Abb. 20 zeigt, trat zwischen LTβR-profizienten und -defizienten Tieren kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der CCL17-Sekretion auf. Damit konnte die Herunterregulation von CCL17 in der Milz nicht auf LTβR-induzierte Signalwege zurückgeführt werden.

### 3.2.2. IFNγR-defiziente Mäuse können CCL17 nach LPS-Stimulation in der Milz induzieren

Da die vorangegangenen Experimente die Vermutung aufkommen ließen, dass IFN-γ die CCL17-Produktion unterbinden könnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob durch gezieltes Unterbinden dieser Einflussnahme eine Induktion von CCL17 in der Milz möglich ist. Zu diesem Zweck wurde durch Einkreuzen von IFNγR-defizienten Mäusen in die CCL17/EGFP-Zucht eine Mauslinie (IFNγR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>) gezüchtet, bei der die CCL17-Expression unter Ausschluss dieser möglicherweise supprimierenden Komponente untersucht werden kann.

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass bereits in den Milzen unbehandelter IFNγR-defizienter Mäuse ein signifikant höherer, wenn auch absolut gesehen immer noch sehr geringer Anteil der DC-Population CCL17 exprimiert.

Eine Stimulation mit dem TLR4-Ligand LPS kann diesen Trend noch weiter verstärken:

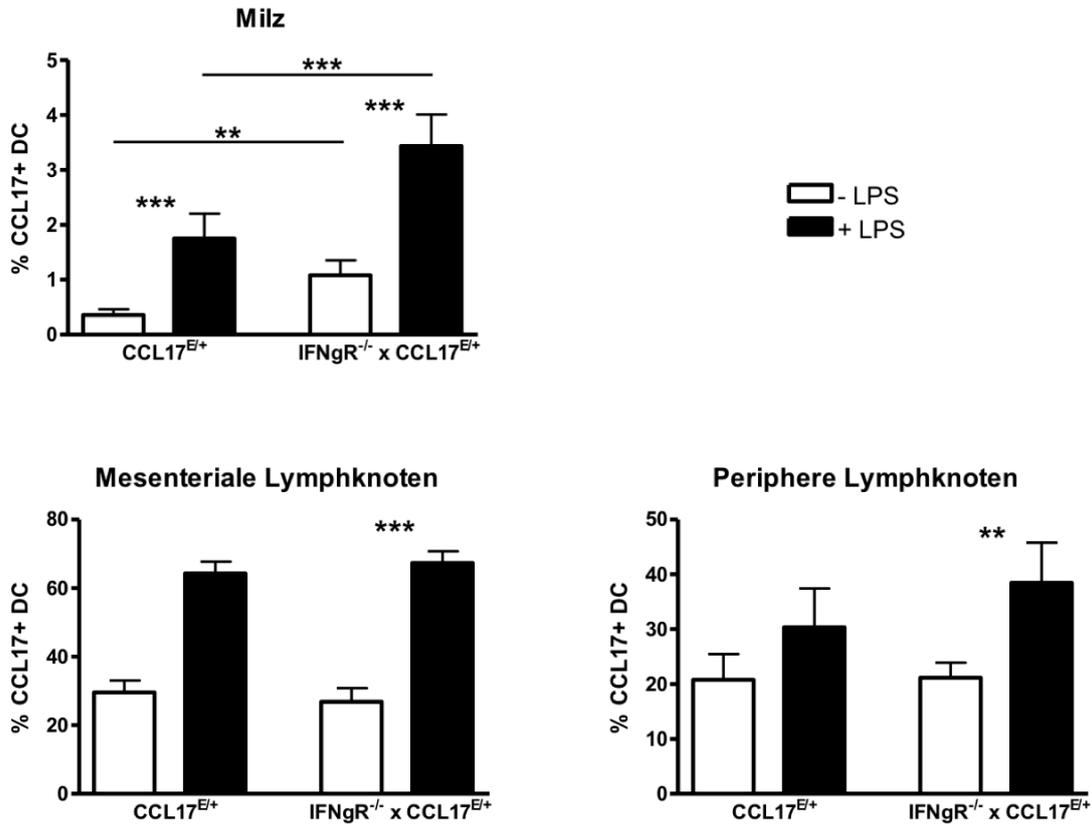


Abbildung 21: IFNγR-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte CCL17-Produktion in der Milz nach LPS. Die Diagramme zeigen die Frequenz CCL17/EGFP-positiver Zellen in der Gesamt-DC-Population aus Milzen, mesenterialen und peripheren (brachialen und inguinalen) Lymphknoten. Untersucht wurden CCL17<sup>E/+</sup>- und IFNγR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse 15 Stunden nach Erhalt einer Injektion von 100 μg LPS i.p. (n = 2-5 Mäuse pro Gruppe).

Die Ergebnisse legen nahe, dass IFN-γ wie ursprünglich vermutet einer Induktion von CCL17 in der Milz entgegenwirkt. Mit dem Wegfall dieses Mechanismus nimmt die Induzierbarkeit in Milz-DC zu. Dagegen scheint IFN-γ auf die CCL17-Produktion in den LK keinen nennenswerten Einfluss auszuüben, da sich die Anteile CCL17-produzierender DC in CCL17<sup>E/+</sup>- und IFNγR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

### 3.2.3. Milz-DC reagieren auf IL-4 und GM-CSF mit CCL17-Produktion

Wie eingangs ausführlicher beschrieben, finden sich in der Literatur zahlreiche Berichte einer CCL17-Induktion durch verschiedene Zytokine. Abhängig von Zelltyp konnten solche Beobachtungen für IL-4, IL-10, IL-13, TNFα, GM-CSF und IFN-γ (Imai et al., 1999; Vestergaard et al., 2000; 2001; Horikawa et al., 2002; Nomura et al., 2002; Faffe et al., 2003; Xiao et al., 2003a; Nasu et al., 2004; Syed et al., 2007; Inoue et al., 2008) gemacht werden.

Ein positiver Effekt auf die CCL17-Produktion in Milz-DC von IFN- $\gamma$  kann zum jetzigen Zeitpunkt ausgeschlossen werden, da das vorherige Experiment die suppressive Wirkung des Zytokins auf CCL17 beweist. Jedoch konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe die Beobachtung gemacht werden, dass die Kultivierung von Knochenmark-DC unter Einsatz von GM-CSF zu einer Stimulation der CCL17-Sekretion führt (N. Gerbitzki, unveröffentlicht).

Daher wurde in dieser Arbeit getestet, ob es auch möglich ist, *ex vivo* Milz-DC aus CCL17<sup>E/+</sup>- und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen durch Zytokinstimulation zur Produktion von CCL17 anzuregen. Nach der Isolation wurden die DC für 24h kultiviert und gegebenenfalls diverse Zytokine allein oder in Kombinationen dem Medium zugesetzt. Dabei wurde für alle Zytokine gleichermaßen die Konzentration von 10 ng/ml verwendet (Stober and Schirmbeck, 2001; Berndt et al., 2007; Onishi et al., 2008; Berger et al., 2009).

Prinzipiell besaß IL-4 bei der gewählten Konzentration die stärkste stimulatorische Wirkung auf die CCL17-Produktion, die in den IFN $\gamma$ R-defizienten Zellen noch weiter erhöht werden konnte; am zweitstärksten wirkte GM-CSF. TNF $\alpha$  hingegen zeigte eine minimale Stimulation. Durch Kombination aller drei Zytokine konnte die jeweilige CCL17-EGFP-Frequenz am stärksten gesteigert werden; jedoch zeigte bereits die Kombination von IL-4 und GM-CSF ähnlich hohe Ergebnisse, die mehr als einen additiven Effekt der beiden einzelnen Zytokine vermuten lassen.

In einem separaten Experiment wurde ausserdem die Effizienz von IL-13 anhand Wildtyp- und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-DC mit IL-4 verglichen. Hierbei wird deutlich, dass IL-13 IL-4 an CCL17-stimulatorischer Wirkung weit unterlegen ist und im Gegensatz zu IL-4 die absolute Menge sezernierten Proteins kaum bzw. nur geringfügig erhöht.

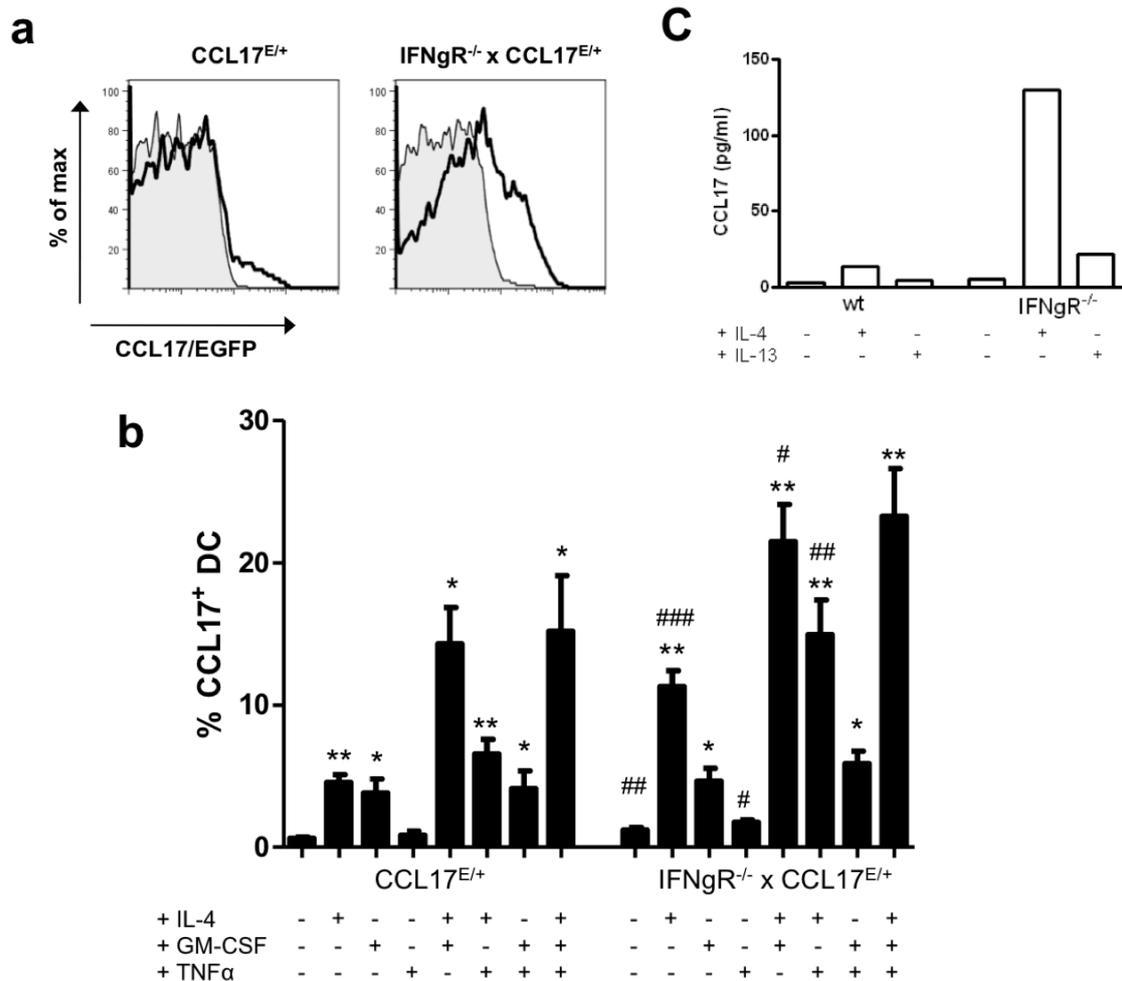


Abbildung 22: Zytokin-induzierte CCL17-Produktion in Milz-DC a) Das Histogramm zeigt die CCL17/EGFP-Fluoreszenz von CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen (links) und IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen (rechts). Die grau schattierte Kurve stellt die Mediumkontrolle dar, die schwarze Linie das Ergebnis einer Kultivierung mit IL-4. b) Das Balkendiagramm fasst alle verschiedenen Kulturbedingungen und ihre Auswirkung auf die Frequenz CCL17/EGFP-positiver Zellen nochmal zusammen. Die Sterne beschreiben das Signifikanzniveau im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle, die Rauten vergleichen identische Kulturbedingungen der verschiedenen Genotypen (n = 3 Experimente). c) Für die Kultur von WT- und IFNgR-defizienten DC ist das Ergebnis einer Stimulation mit IL-4 und/oder IL-13 auf die CCL17-Sekretion in den Kulturüberstand dargestellt (Daten von einem aus vier identischen Experimenten).

### 3.2.4. $\alpha$ -Galactosylceramid induziert CCL17 *in vivo*

Yamaguchi et al. beschrieben 1996 erstmals das Glykolipid  $\alpha$ -Galactosylceramid, im folgenden GalCer, welches einer natürlichen Komponente aus dem Meeresschwamm *Agelas mauritianus* nachempfunden wurde (Yamaguchi et al., 1996). Es handelt sich dabei um einen spezifischen Liganden des invarianten T-Zell-Rezeptors auf humanen und murinen NKT-Zellen, denen das Molekül

---

mittels des nicht-klassischen MHC I-ähnlichen CD1d-Rezeptors (Kawano et al., 1997) dendritischer Zellen präsentiert wird.

Aufgrund dieser Aktivierung kommt es bei den NKT-Zellen zu einer Ausschüttung zahlreicher Zytokine. Seit langem bekannt ist die Produktion von IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$ ; weiterhin wurde aber auch die Sekretion von TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-3 und IL-22 und anderen nachgewiesen (Burdin et al., 1999; Leite-de-Moraes et al., 2002; Biburger and Tiegs, 2005; Goto et al., 2009).

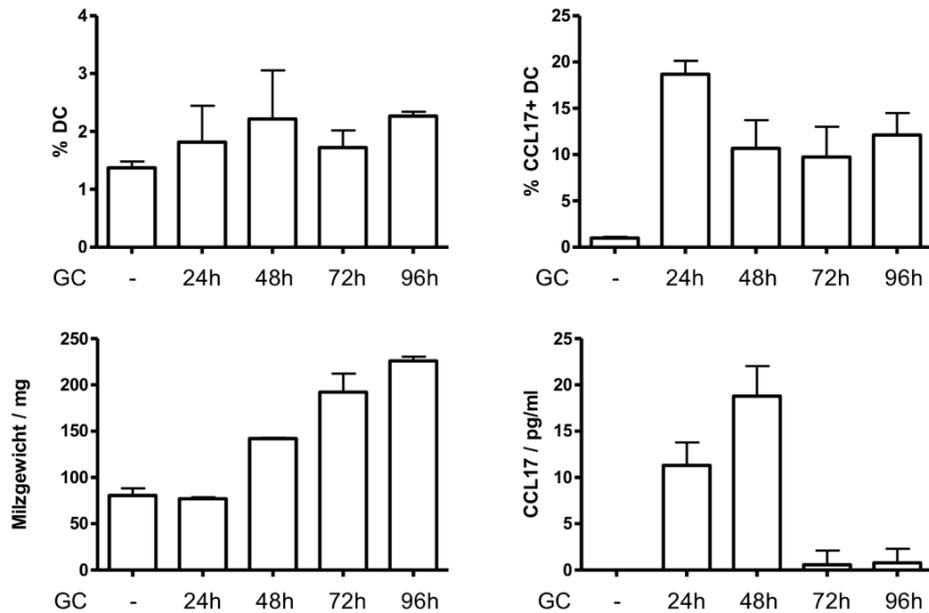
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vivo*-Applikation von GalCer als ein Modell für die Induktion von CCL17 betrachtet (Semmling et al., 2010), wahrscheinlich über die systemische Induktion von IL-4 und/oder GM-CSF.

Da, wie zuvor gezeigt, IFN- $\gamma$  als das wichtigste T<sub>H</sub>1-Zytokin an der CCL17-Suppression in der Milz beteiligt ist, sollte untersucht werden, ob IL-4 als T<sub>H</sub>2-Zytokin möglicherweise auch *in vivo* den gegenteiligen Effekt besitzt.

Zu diesem Zweck wurde nach Orientierung an Literaturangaben zunächst eine Dosis von 2  $\mu$ g GalCer für die weiterfolgenden Untersuchungen festgelegt und die Auswirkungen einer Einzelgabe näher analysiert (Nishimura et al., 2000; Hayakawa et al., 2003; van Dommelen et al., 2003; Kojo et al., 2009).

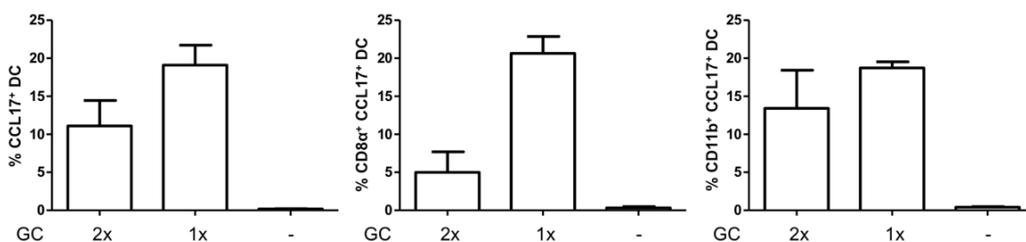
Vergleicht man die Auswirkung einer Einzeldosis von 2  $\mu$ g GalCer über die Zeit hinweg, lässt sich erkennen, dass 24 h nach Injektion der prozentuale Anteil CCL17-positiver DC am höchsten ist, bevor er wieder zurückgeht (Abb. 23). Im Gegensatz dazu scheinen allerdings diejenigen DC, die nach 48 h noch CCL17 sezernieren, dieses noch mindestens ebenso stark zu tun wie 24 h zuvor.

Eine weitere Beobachtung, die hinsichtlich des Milzgewichtes gemacht werden konnte, zeigt eine noch bis 96 h nach Gabe anhaltende Splenomegalie mit Zunahme auf mehr als das doppelte des ursprünglichen Gewichts, die sich jedoch auf keine spezifische Zellpopulation zurückführen ließ.



**Abbildung 23: Untersuchung der Auswirkungen von GalCer (I).** CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse wurden mit einer Einzeldosis von 2 µg GC behandelt und nach verschiedenen Zeitintervallen analysiert. Dargestellt sind die Frequenz CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> Zellen an allen lebenden Zellen (oben links), die der CCL17-positiven DC an der Gesamt-DC-Population (oben rechts), die Entwicklung des Milzgewichts (unten links) sowie die Konzentration von CCL17-Protein im Überstand von für 24h kultivierten angereicherten DC.

In einem weiteren Versuch sollte ermittelt werden, ob sich die Frequenz CCL17-positiver DC durch mehrfache Injektion von GalCer noch steigern lässt. Zu diesem Zweck erhielten CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse entweder eine einmalige oder zwei im Abstand von 24 Stunden aufeinanderfolgende i.p.-Gaben der Substanz.



**Abbildung 24: Untersuchung der Auswirkungen von GalCer (II)** Verglichen wurde eine einmalige Injektion von 2 µg GalCer mit einer zweimaligen, nach 24 h wiederholten Gabe. Die Analyse erfolgte 24 h nach der letzten Injektion des NKT-Stimulans. Untersucht wurden Milzen von CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen im Hinblick auf die Frequenz CCL17-exprimierender DC an der Gesamt-DC Population (links), die an der CD8<sup>+</sup>-DC-Population (Mitte) und an CD11b<sup>+</sup> DC (rechts).

Interessanterweise ist erkennbar, dass nach zweimaliger Injektion die Frequenz CCL17-exprimierender DC nicht weiter ansteigt oder zumindest gleich bleibt, sondern im Gegenteil sogar wieder zurückgeht. Dieser Rückgang scheint vor allem den Anteil CCL17-positiver CD8α<sup>+</sup> DC zu

betreffen, da in dieser Zellpopulation die Frequenz um einen weit größeren Anteil sinkt als in den CD11b<sup>+</sup> DC. Möglicherweise werden also bereits bei der ersten Gabe gegenregulatorische Mechanismen eingeleitet, welche dem durch NKT-Zell-Stimulation hervorgerufenen Zytokinüberschuss entgegenwirken.

Nach Abschluss der Etablierungsexperimente an CCL17-Reporter-Mäusen wurden auch IFN $\gamma$ R-defiziente Tiere miteinbezogen und hinsichtlich ihrer CCL17-Expression untersucht.

CCL17<sup>E/+</sup>- und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse wurden wie festgelegt mit intraperitonealer GalCer-Gabe behandelt und die CCL17-Induktion 24 h später mikroskopisch und durchflusszytometrisch verfolgt.

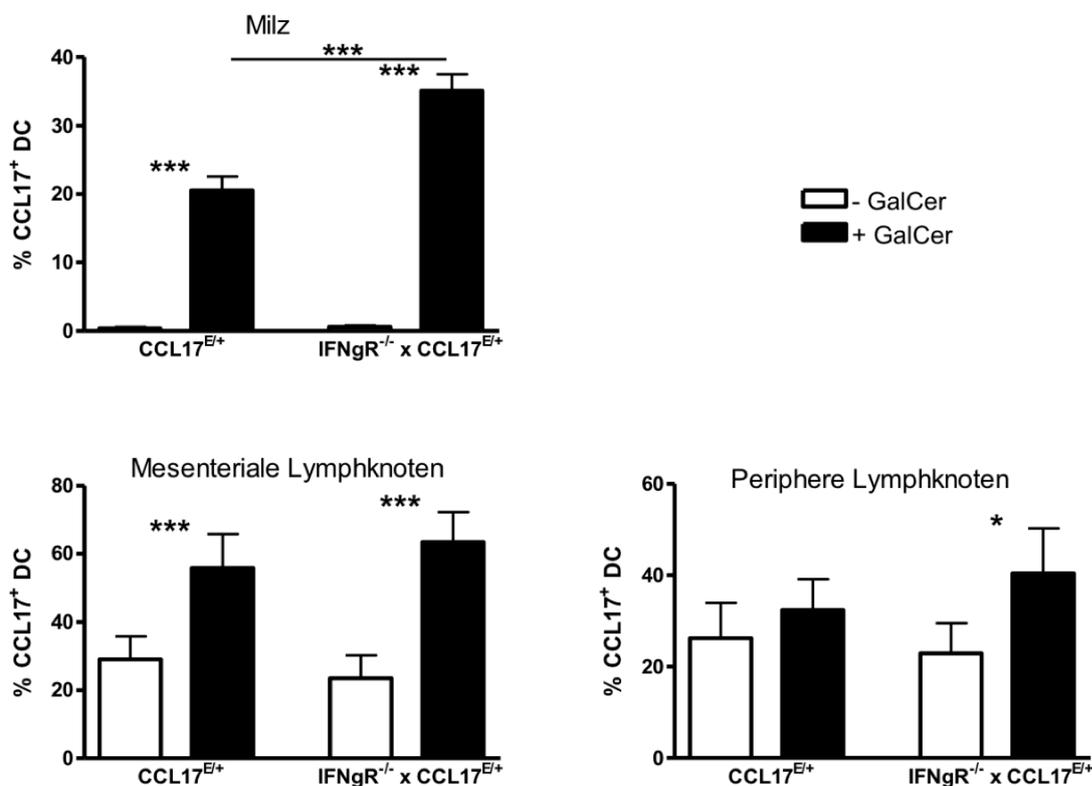


Abbildung 25: GalCer verstärkt den prozentualen Anteil CCL17-produzierender DC in der Milz. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil CCL17/EGFP-positiver DC an der Gesamt-DC-Population der Milz, mesenterialer oder peripherer (brachialer und inguinaler) Lymphknoten. Untersucht wurden CCL17<sup>E/+</sup>- und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse 24 Stunden nach Injektion von 2  $\mu$ g GalCer oder Lösungsmittel i.p. (n = 5-6 Mäuse /Gruppe).

Die Auswertung der FACS-Plots zeigt, dass in den CCL17-Reporter-mäusen, die normalerweise nur einen sehr geringen Anteil CCL17/EGFP-positiver DC in der Milz aufweisen, die Gabe von GalCer zu einem hoch signifikanten Anstieg auf etwa 20 Prozent (20,54%  $\pm$  2,01 vs. 0,39%  $\pm$  0,19 unbehandelt) führt. Im Vergleich dazu führt der Verlust der gegenregulierenden IFN- $\gamma$ -Komponente zu einem weiteren hoch signifikanten Zuwachs der Frequenz CCL17-produzierender DC auf 35 Prozent (35,08%  $\pm$  2,43 vs. 0,58  $\pm$  0,21 unbehandelt).

Auch mikroskopisch ist deutlich die starke CCL17-induzierende Wirkung von GalCer zu erkennen; in den CCL17<sup>E/+</sup>-Milzen finden sich nach Behandlung viele CCL17<sup>+</sup> DC innerhalb der T-Zell-Zonen der weissen Pulpa wieder. In den IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Milzen steigt dort ebenfalls die Zahl CCL17<sup>+</sup> DC an, jedoch wesentlich stärker, und auch in der Marginalzone sind hier grün fluoreszierende Zellen zu sehen:

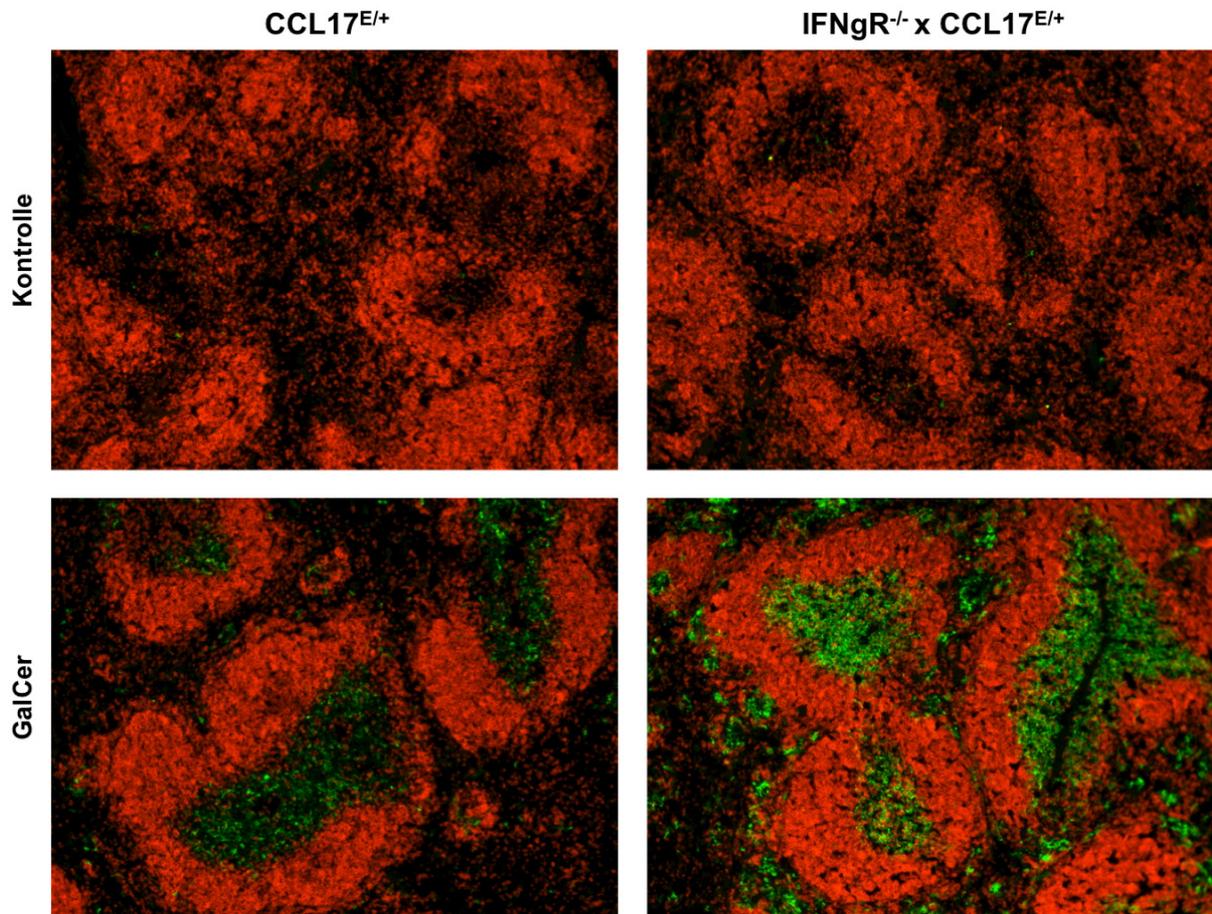
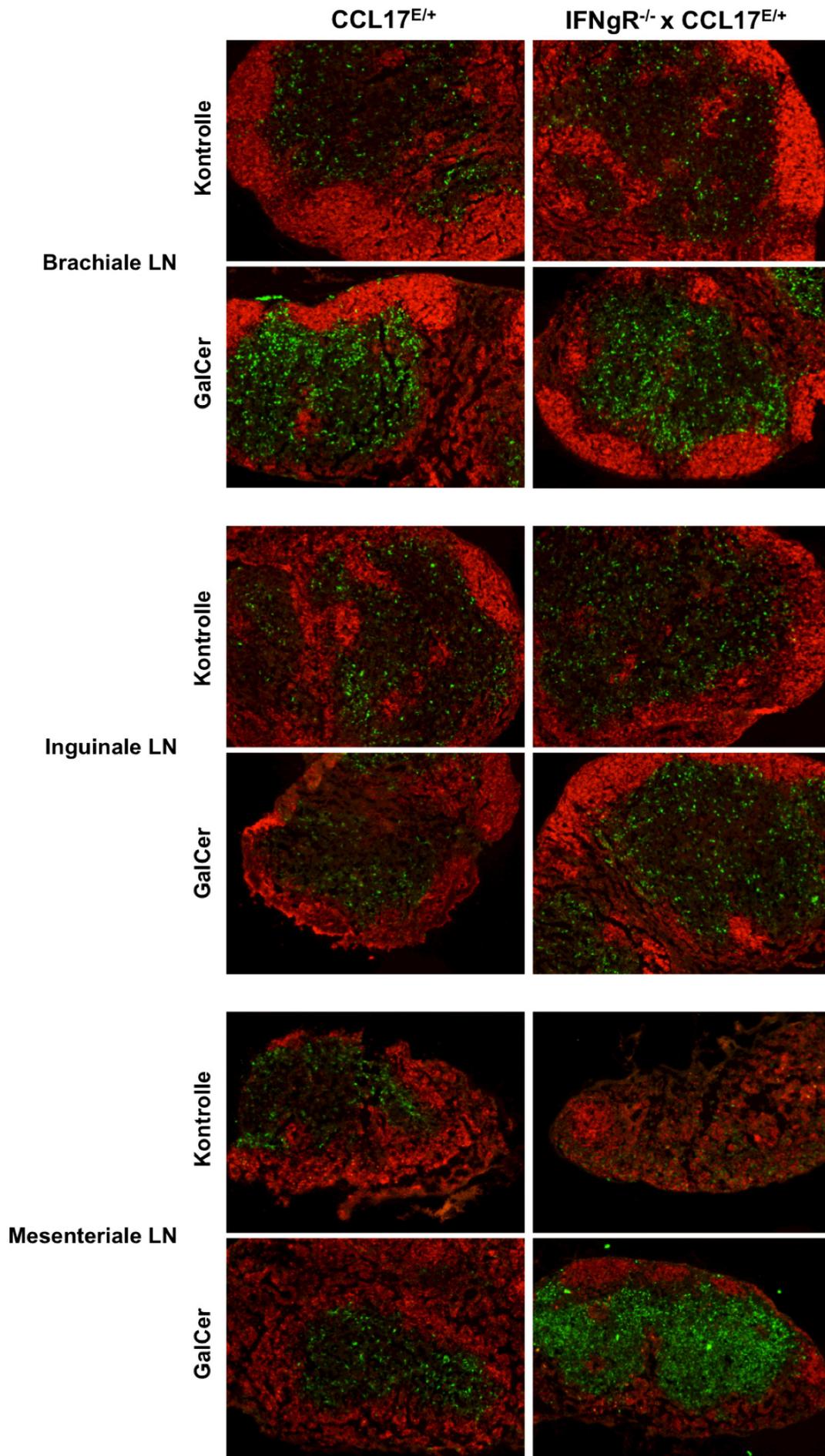


Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EGFP-Expression in der Milz. Abgebildet sind Milz-Gefrierschnitte von CCL17<sup>E/+</sup>- (links) und IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen (rechts). Die obere Reihe zeigt Bilder unbehandelter, die untere Reihe Bilder mit 2 µg GalCer behandelte Tiere (100-fache Vergrößerung). In grün dargestellt ist CCL17/EGFP, in rot B220.

Abbildung 27 (nächste Seite): Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EGFP-Expression in LK. Die Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) zeigen brachiale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten von CCL17<sup>E/+</sup>- (links) und IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen (rechts).



Zusätzlich fällt auf, dass die EGFP-Fluoreszenz IFN $\gamma$ R-defizienter Tiere in der Milz heller zu sein scheint als in den normalen Reporter-mäusen. Dieses findet sich in der Median Fluorescence Intensity (MFI) jedoch nur bedingt wieder:

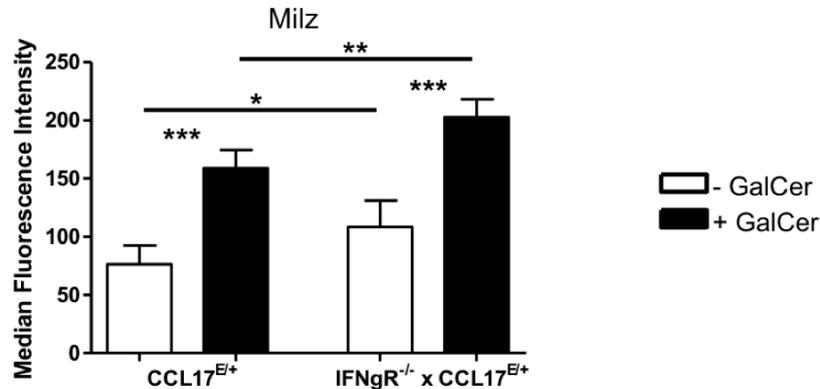


Abbildung 28: Median Fluorescence Intensity EGFP-exprimierender DC nach GalCer-Behandlung. Das Balkendiagramm gibt die MFI der EGFP-Fluoreszenz der CCL17-positiven Milz-DC aus dem vorherigen Experiment wieder. Bei der MFI handelt es sich um ein statistisches Maß für die Helligkeit einer fluoreszierenden Zellpopulation, welches im Vergleich zur früher verwendeten Mean Fluorescence Intensity bei einer wie hier gegebenen Nicht-Gauss'schen Verteilung robuster gegenüber Ausreißern ist (n = 5-6 Mäuse/Gruppe).

Auf Proteinebene bestätigt sich ebenfalls, dass angereicherte Milz-DC mit GalCer behandelte Tiere generell mehr CCL17 produzieren als die Kontrolltiere. Interessant ist hierbei jedoch erneut die auch bereits in der Histologie aufgetretene Diskrepanz zwischen Wildtyp- und IFN $\gamma$ R-defizienten DC: Während das vorangegangene Experiment zeigte, dass die Frequenz CCL17-positiver Zellen in der Milz in IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Tieren etwa doppelt so hoch liegt wie in den CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen, zeigt der ELISA, dass bei unterbleibendem IFN- $\gamma$ -Signaling die DC auch wesentlich aktiver CCL17 produzieren und fast um den Faktor 50 größere Mengen des Chemokins in den Kulturüberstand sezernieren.

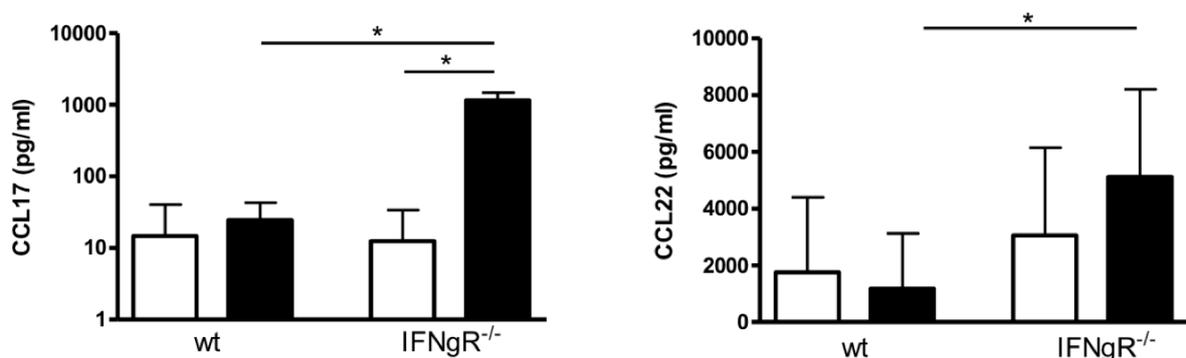


Abbildung 29: CCL17- und CCL22-Proteinproduktion durch Milz-DC nach GalCer. Die Diagramme zeigen die mittels ELISA detektierten Mengen an CCL17 und CCL22 in Überständen angereicherter und 24 h kultivierter *ex vivo*-Milz-DC. Untersucht wurden DC aus Wildtyp- und IFN $\gamma$ R-defizienten Mäusen, die 24h zuvor mit GalCer bzw. Lösungsmittel behandelt worden waren (n = 3 Experimente).

Dieselben Überstände wurden ebenfalls im Hinblick auf CCL22-Protein analysiert. Generell wird dieses Chemokin weit stärker produziert als CCL17; ein signifikanter Trend zur verstärkten Produktion nach GalCer-Behandlung konnte in diesen Experimenten jedoch nur für IFN $\gamma$ R-defiziente DC abgelesen werden. Auch stieg die Konzentration durch die Vorbehandlung bei weitem nicht so stark an, wie es zuvor bei CCL17 der Fall gewesen war.

Somit bleibt die Frage offen, weshalb die in IFN $\gamma$ R-defizienten DC stark erhöhte Produktivität von CCL17-Protein sich nicht bzw. nicht so stark wie erwartet in einer Erhöhung der MFI im EGFP-Reporter widerspiegelt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das intrazelluläre EGFP-Protein eine Sättigung zeigt und ab einem gewissen Punkt entweder die Translation oder posttranslationale Modifikationsprozesse zum Erliegen kommen.

### 3.2.5. Charakterisierung CCL17-produzierender Milz-DC

Histologisch fällt auf, dass vor allem in den IFN $\gamma$ R $^{-/-}$  x CCL17 $^{E/+}$ -Milzen nach einmaliger Injektion von GalCer auch verstärkt in der Marginalzone CCL17-positive Zellen zu finden sind. Um auszuschließen, dass hier neben DC weitere Zellen die Fähigkeit zur CCL17-Produktion erlangen, und um die DC hinsichtlich ihrer Subpopulationen zu charakterisieren, wurden Milzen aus CCL17 $^{E/+}$ - sowie IFN $\gamma$ R $^{-/-}$  x CCL17 $^{E/+}$ -Tieren durchflusszytometrisch näher untersucht.

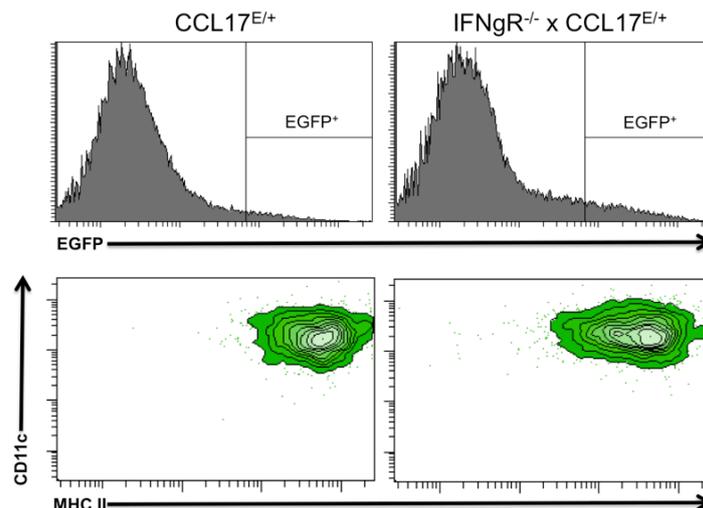


Abbildung 30: Charakterisierung CCL17-produzierender Milz-DC (I). Milzen aus GalCer-vorbehandelten CCL17 $^{E/+}$ - (links) und IFN $\gamma$ R $^{-/-}$  x CCL17 $^{E/+}$ -Mäusen (rechts) wurden mittels MACS für CD11c angereichert (Reinheit ca. 30-40%). Die Histogramme (oben) zeigen die EGFP-Fluoreszenz aller im Livegate befindlichen Zellen; die Kontur-Plots (unten) zeigen die Fluoreszenzen für CD11c und MHC II der als EGFP-positiv vorselektierten Zellen.

---

Wie die Analyse der EGFP-positiven Zellen in Abb. 30 zeigt, exprimieren diese tatsächlich alle die Marker CD11c sowie MHC II auf ihrer Oberfläche und gehören somit zu den DC.

Im Folgenden wurde daher für die weiteren Analysen immer auf die DC-Population gegatet und die Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht (s. Abb. 31).

Die ursprüngliche Aussage, dass CCL17 hauptsächlich von  $CD8\alpha^+CD11b^+$  DC produziert wird, erweist sich zwar als weitestgehend treffend (Alferink et al., 2003); allerdings erkennt man vor allem in der Darstellung von  $CD8\alpha$  gegen EGFP deutlich auch einige doppelt positive DC bzw. umgekehrt, auch einige  $CD11b$ -negative DC. Somit kann die Beobachtung aus Semmling et al. bestätigt werden (Semmling et al., 2010), die ebenfalls eine CCL17-Sekretion durch  $CD8\alpha^+$  Milz-DC nach GalCer-Behandlung publizierten und diese Population für eine NKT-Zell-abhängige Kreuzpräsentation verantwortlich sehen.

Dagegen scheinen die CCL17-sezernierenden DC weitestgehend negativ für CD4 zu sein, wie auch für die Marker B220, F4/80, Gr1 und IFNAR. Demzufolge erlangen also z.B. pDC, die B220 und CD317 (pDCA-1; Tetherin) exprimieren, nicht die Fähigkeit zur CCL17-Produktion (Nakano et al., 2001).

28,4	3,5	31,1	5,3
57,4	10,7	48,1	15,5

13,8	5,2	21,5	3,6
67,1	13,8	62,0	13,0

5,8	30,0	2,5	34,9
9,4	54,8	9,7	52,9

16,7	14,3	24,8	10,6
30,4	38,7	42,8	21,8

27,4	4,9	24,8	10,4
56,7	11,0	42,8	21,8

21,0	3,6	25,1	7,1
61,5	13,9	43,7	24,1

19,9	0,7	26,0	1,1
74,5	4,9	70,1	2,8

29,7	1,9	34,2	0,9
62,3	6,1	61,8	3,1

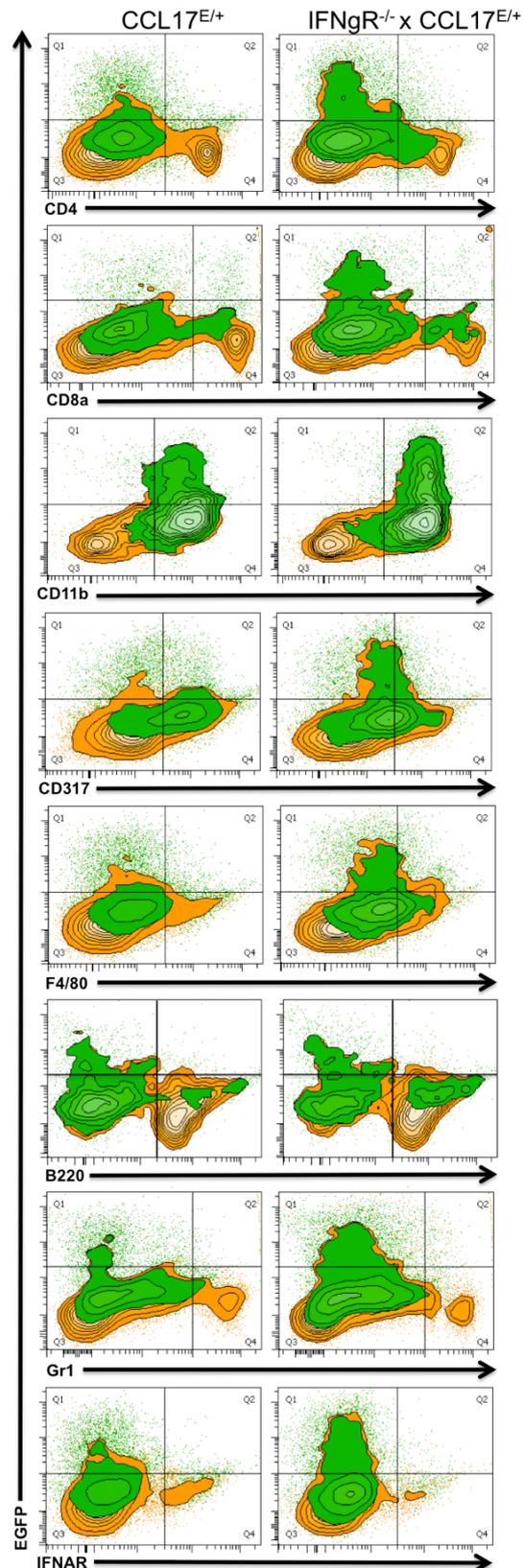


Abbildung 31: Charakterisierung CCL17-produzierender Milz-DC (II). Untersucht wurden Einzelzell suspensionen aus einmalig mit GalCer vorbehandelten CCL17<sup>E/+</sup>- (links) und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Milzen (rechts). Die FACS-Plots zeigen die Expression verschiedener Oberflächenmarker (CD4, CD8a, CD11b, CD317, F4/80, B220, Gr1 und IFNAR) gegen CCL17/EGFP. In orange dargestellt sind alle im Livegate enthaltenen Zellen, in grün die darin enthaltenen CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> DC. Die Legende links gibt die prozentuale Verteilung der CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> DC auf die dargestellten Quadranten an.

### 3.2.6. Splenozyten zeigen eine verstärkte Zytokinsekretion durch Vorbehandlung mit GalCer

Um einen Eindruck zu erlangen, welche Zytokine durch die Behandlung mit GalCer, höchstwahrscheinlich durch die aktivierten NKT-Zellen, in verstärktem Maße ausgeschüttet werden und somit an der lokalen Induktion von CCL17 in der Milz beteiligt sein könnten, wurden aus Milzen 24 Stunden zuvor mit GalCer behandelte Mäuse Gesamt-Splenozyten-Suspensionen hergestellt und diese kultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Kulturüberstände mittels ELISA untersucht. Zusätzlich von Interesse war die Klärung der Frage, ob weitere Zytokine ebenfalls durch Wegfall des IFN- $\gamma$ -Signalings verändert induziert werden; daher wurden ebenfalls IFN $\gamma$ -defiziente Tiere in das Experiment miteinbezogen.

Wie in Abb. 32 zu erkennen ist, werden die meisten der getesteten Zytokine durch die Vorbehandlung mit GalCer induziert. Hierbei ist vor allem GM-CSF zu nennen, welches ohne GalCer nicht in nachweisbaren Mengen in den Kulturüberständen enthalten ist, jedoch durch Behandlung detektierbar wird und in den IFN $\gamma$ -defizienten Splenozyten sogar um ein Vielfaches stärker produziert wird. IFN- $\gamma$  scheint somit nicht nur auf direktem Wege die Produktion von CCL17 zu unterdrücken, sondern ebenfalls über eine Suppression CCL17-induzierender Zytokine.

Auch bei TNF $\alpha$  und IL-4, die ja in den vorangegangenen Experimenten sowie in der Literatur CCL17-induzierende Wirkung besitzen, kann eine durch GalCer gesteigerte Produktion beobachtet werden, die jedoch weniger deutlich ausgeprägt ist als bei GM-CSF.

Somit erscheint es wahrscheinlich, dass diese drei Zytokine mechanistisch an der verstärkten Bildung von CCL17 nach GalCer-Injektion beteiligt sind. Jedoch wurde TNF $\alpha$  aufgrund seiner in Abb. 22 dargestellten nur sehr geringfügigen Wirkung auf angereicherte Milz-DC für das folgende Experiment vernachlässigt.

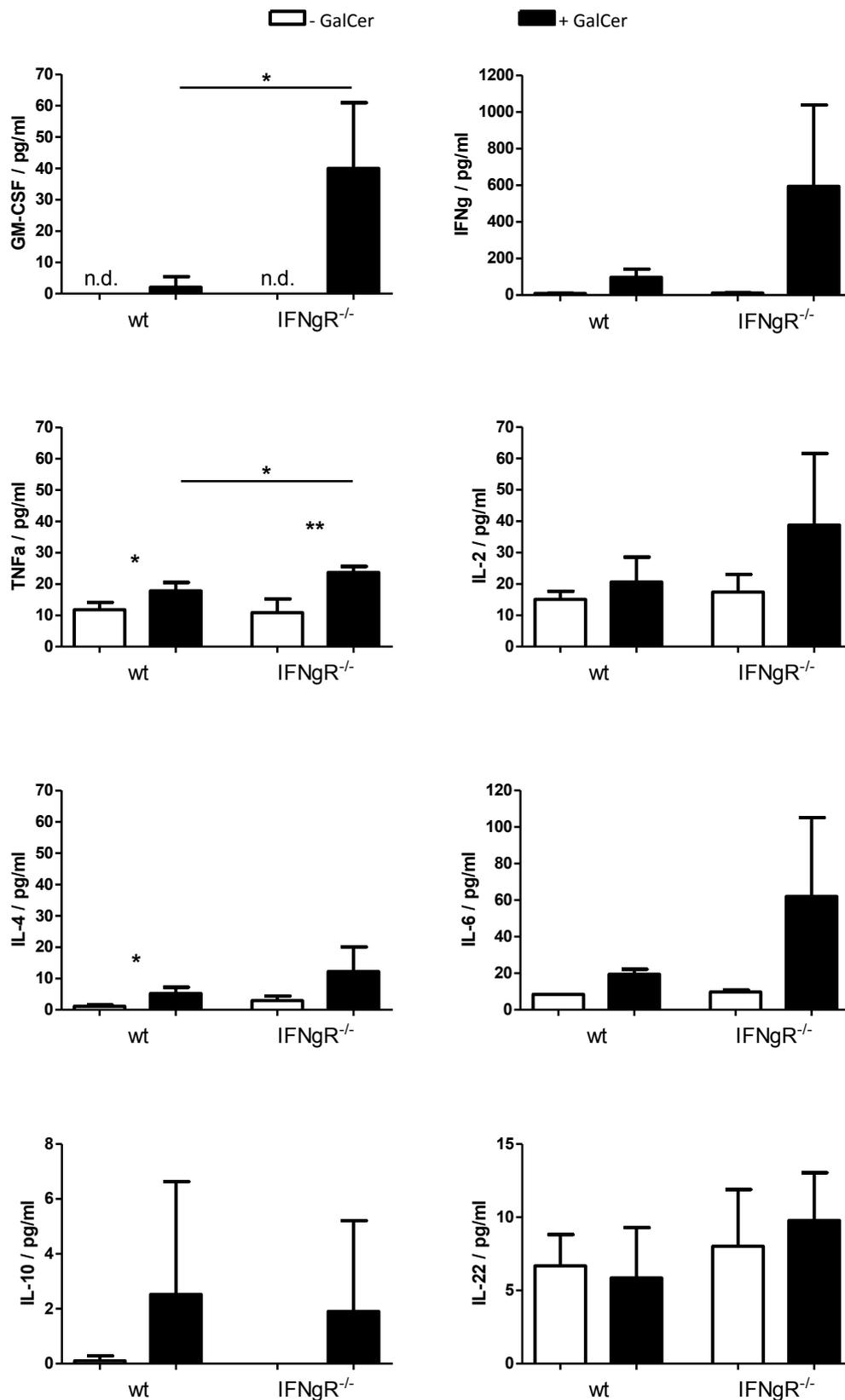


Abbildung 32: Zytokinproduktion von Splenozyten nach einmaliger Gabe von GalCer. Für das Experiment wurden WT- und IFNγR<sup>-/-</sup>-Mäuse einmalig mit 2 μg GalCer bzw. Lösungsmittel behandelt. 24h später wurden die Milzen entnommen, und daraus gewonnene Einzelzellsuspensionen für weitere 24h in Kultur genommen. Die Überstände wurden mittels ELISA untersucht. Die Graphen enthalten gepoolte Daten aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

### 3.2.7. Die Neutralisierung von IL-4 und GM-CSF kann der Produktion von CCL17 entgegenwirken

Da IL-4 und GM-CSF ja, wie in Abb. 22 für angereicherte *ex vivo* Milz-DC gezeigt, die stärkste stimulatorische Wirkung auf die CCL17-Produktion hatten, und zudem verstärkt nach Gabe von GalCer sezerniert wurden, stellte sich die Frage, ob diese beiden Zytokine den einzigen Mechanismus für die GalCer-induzierte CCL17-Produktion darstellen und ob ein Ausschalten dieses Signalwegs die CCL17-Produktion nach GalCer in der Milz unterbinden kann.

Daher sollte die Auswirkung einer Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-4 und GM-CSF auf die CCL17-Sekretion nach GalCer untersucht werden.

Es war jedoch abzusehen, dass bei der in den vorangegangenen Experimenten gewählten Dosis von 2 µg/Maus eine sehr große Menge der genannten Zytokine freigesetzt wird (siehe Abschnitt 3.2.6.), so dass für deren Neutralisation sehr große Mengen Antikörper benötigt worden wären. Die Durchführung des Experiments wäre einerseits sehr kostspielig; ausserdem könnte eine derart hohe Dosis von Antikörpern ebenfalls unerwünschte Effekte mit sich bringen.

Daher wurde vorab einmalig eine Titration von GalCer durchgeführt, um eine Dosisreduktion durchführen zu können. Wie in Abb. 33 zu sehen ist, zeigte sich bei Einzeldosen ab 100 ng/Maus ein ausreichend hoher Anteil an CCL17-positiven DC in der Milz, so dass die Dosis für die folgenden Experimente auf 200 ng festgelegt wurde.

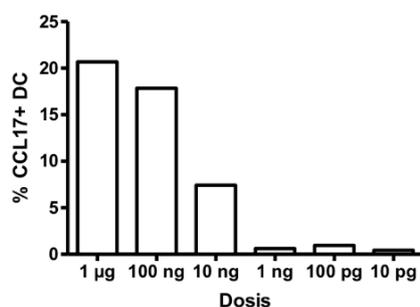
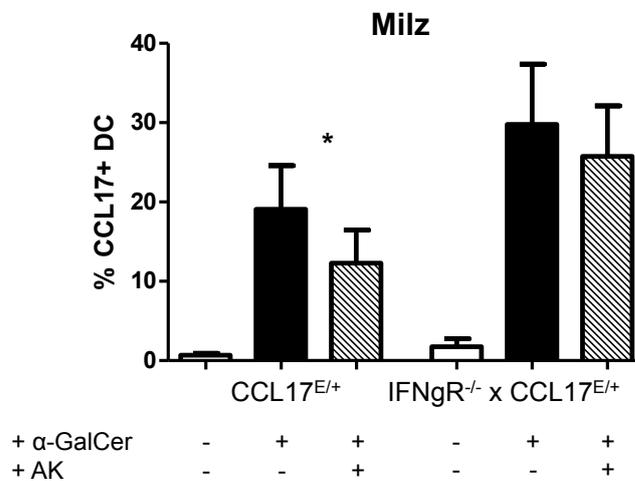


Abbildung 33: Abhängigkeit des Anteils CCL17-produzierender DC von der GalCer-Dosis. Die Graphen zeigen die Anteile an CCL17-positiven DC an der Gesamt-DC-Fraktion (links) bzw. die der CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>-Zellen an allen lebenden Zellen (rechts) in der Milz von CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen 24h nach einmaliger Injektion einer Dosis von PBS-57.

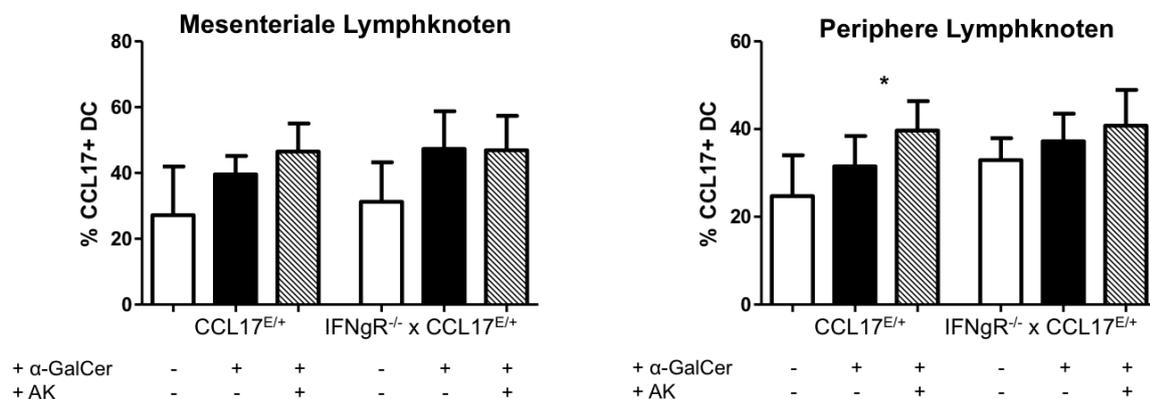
Daher wurden Mäuse erst mit je 100 µg neutralisierenden Antikörpern gegen IL-4 und GM-CSF vorbehandelt und erhielten dann 1h später eine Dosis von 0,2 µg GalCer. Nach 24 Stunden wurde die Frequenz der EGFP-positiven DC in der Milz analysiert. Wie in Abb. 34 zu sehen ist, konnte der Anteil CCL17-positiver DC in CCL17<sup>E/+</sup>-DC wie auch in IFNγR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-DC durch die Vorbehandlung mit

den Antikörpern im Vergleich zur reinen GalCer-Behandlung leicht gesenkt werden. Allerdings waren die Ergebnisse bei der aktuellen Fallzahl nur für die CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse statistisch signifikant.



**Abbildung 34:** Neutralisierende Antikörper gegen IL-4 und GM-CSF wirken der CCL17-Produktion in Milz-DC entgegen (I). Die Gabe neutralisierender Antikörper (AK) gegen IL-4 und GM-CSF vor GalCer-Behandlung (schraffierte Balken) zeigt eine leichte Reduktion der CCL17-positiven DC in der Milz von CCL17<sup>E/+</sup>- und IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen im Vergleich zur reinen GalCer-Gabe (schwarze Balken). Der Graph enthält Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6-7 Mäusen pro Gruppe.

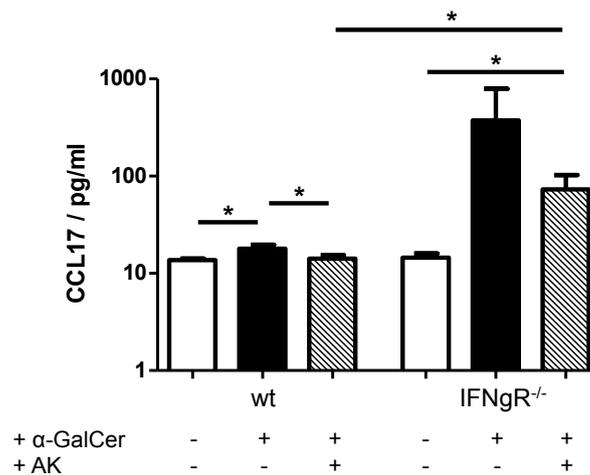
Interessanterweise handelt es sich bei der Senkung der CCL17-Produktion durch die Gabe neutralisierender Antikörper um einen organspezifischen Effekt: In mesenterialen sowie peripheren LK wirkt sich die Vorbehandlung von Mäusen mit anti-IL-4 und -GM-CSF vor GalCer-Injektion tendenziell eher positiv aus. Möglicherweise spielen hier andere regulatorische Mechanismen eine Rolle. Auf Langerhans-Zellen besitzt GM-CSF z.B. eher eine CCL17-inhibierende Wirkung (Xiao et al., 2003a); ähnliches könnte auch hier der Fall sein, so dass die Neutralisation von GM-CSF sich in den LK CCL17-induzierend auswirkt.



**Abbildung 35:** Keine Inhibierung der CCL17-Produktion in den LK. In mesenterialen und peripheren (brachialen und inguinalen) Lymphknoten bewirkt die Vorbehandlung von CCL17<sup>E/+</sup>- und IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen mit neutralisierenden Antikörpern (AK) gegen IL-4 und GM-CSF vor GalCer-Injektion keine Reduktion der Frequenz CCL17-positiver DC (n = 6-7 Mäuse/Gruppe).

Wie vorangehende Experimente gezeigt haben, erhöht GalCer aber nicht nur die Frequenz der CCL17-produzierenden DC, sondern ist ebenfalls in der Lage, auch deren CCL17-Produktion auf Proteinebene zu steigern. Besonders ohne die gegenregulatorische Komponente des IFN- $\gamma$ -Signalweges konnte die Menge des sezernierten Proteins sehr stark ansteigen. Deshalb wurde die Untersuchung der Auswirkung einer IL-4-/GM-CSF-Neutralisation auch auf CCL17-Protein-Produktion der Milz-DC ausgeweitet.

Wie in Abb. 36 zu erkennen ist, zeigt die Bestimmung der absoluten Menge sezernierten Proteins sehr viel deutlicher als zuvor die eGFP-FACS-Analyse den Effekt der Zytokin-Neutralisation: Der ohnehin relativ geringe Anstieg bei den WT-DC wird durch die Antikörper nahezu vollständig aufgehoben. Vor allem jedoch bei den IFN $\gamma$ R-defizienten DC, deren Produktivität durch GalCer in diesem Experiment auf das 26-fache gesteigert wird (unbehandelt MW 14,48 pg/ml vs. MW 375,5 pg/ml nach GalCer), kommt es zu einem starken Abfall auf nur noch ein Fünftel (MW 73,27 pg/ml).

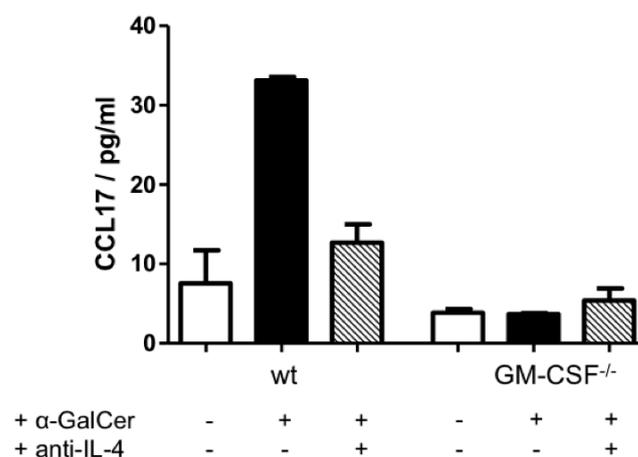


**Abbildung 36:** Neutralisierende Antikörper gegen IL-4 und GM-CSF wirken der CCL17-Produktion in Milz-DC entgegen (II). WT- und IFN $\gamma$ R-defiziente Mäuse erhielten 0,2  $\mu$ g GalCer 1 h nach Injektion von neutralisierenden anti-IL-4- und anti-GM-CSF-Antikörpern. Nach 24 h wurden Milz-DC angereichert und für weitere 24 h in Kultur genommen. Die CCL17-Proteinspiegel im Kulturüberstand wurden mittels ELISA bestimmt (n = 3 Experimente).

Zusammenfassend hatte die *in vivo*-Neutralisation von GM-CSF und IL-4 in der Milz entgegen der Erwartung nur eine relativ geringe Absenkung der Frequenz CCL17-produzierender DC zur Folge. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass möglicherweise noch ein weiteres, bisher nicht entdecktes Zytokin eine Rolle für die CCL17-Produktion *in vivo* spielt. Das könnte beispielsweise TNF $\alpha$  sein, das ja in Langerhans-Zellen CCL17-induzierende Eigenschaften besitzt, jedoch in den vorangehenden Experimenten mit *ex vivo* Milz-DC keine besonders große Rolle zu spielen schien.

Ebenfalls möglich ist aber auch, dass die injizierte Dosis der Antikörper nicht ausreichend war, um die großen Mengen freigesetzter Zytokine nach NKT-Zell-Stimulation komplett zu neutralisieren. Zwar wurde eine im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten um den Faktor zehn reduzierte Dosis von GalCer verabreicht; jedoch kann auch diese noch eine starke Zytokin-Produktion zur Folge haben. Zusätzlich sind die Zytokin-vermittelten Effekte häufig auto- oder parakriner Art, was unter anderem daran ersichtlich wird, dass isolierte Splenozyten auf Stimulation mit GalCer hin zwar gut detektierbare Mengen Zytokine freisetzen, im Serum von behandelten Mäusen ein Anstieg jedoch meist nur schwierig nachzuweisen ist. Somit müsste die lokale interstitielle Antikörper-Konzentration ausreichend hoch sein, um schnell und quantitativ die Wirkung der Zytokine zu unterbinden. Dieses ließe sich aber wahrscheinlich wenn überhaupt nur mit einer wesentlich größeren Antikörperdosis erzielen, die jedoch aus Kostengründen nicht ausgetestet werden konnte.

Um die Auswirkungen eines vollständigen Wegfalls des Zytokins GM-CSF auf die CCL17-Produktion zu untersuchen, wurde das vorangegangene Experiment mit GM-CSF-defizienten Mäusen wiederholt (Stanley et al., 1994); die vorgenommene Zytokin-Neutralisierung erfolgte hier nur noch gegen IL-4.



**Abbildung 37:** GM-CSF-defiziente Mäuse zeigen keine CCL17-Produktion nach GalCer. WT- und GM-CSF-defiziente Mäuse wurden mit neutralisierendem anti-GM-CSF-Antikörper vorbehandelt. 1h nach Injektion erhielten sie 0,2 µg GalCer. Nach 24 h wurden Milz-DC angereichert und für 24 h in Kultur genommen; die Proteinbestimmung erfolgte durch ELISA (n = 2-3 unabhängige Messwerte pro Gruppe).

Da unter diesen Voraussetzungen keine Abhängigkeit von der Pharmakokinetik eines anti-GM-CSF-Antikörpers mehr besteht, wird hier der Effekt eines Verlusts dieses Zytokins sehr deutlich. GM-CSF-defiziente Milz-DC zeigen durch die GalCer-Behandlung keinerlei CCL17-Produktion. Anscheinend hat IL-4, welches ja als potentieller CCL17-Induktor verfügbar bleibt, allein keine besonders starke Wirkung *in vivo*.

### 3.3. Einfluss von CCL17 auf die humorale Immunabwehr

Reife, naive B-Zellen exprimieren zunächst membranständige B-Zell-Rezeptoren von der IgM- bzw. IgD-Klasse. Aktivierung kann einerseits eine Differenzierung zur IgM-sezernierenden Plasmazelle zufolge haben; somit wird im Fall einer Infektion eine erste Welle von Antikörpern hoher neutralisierender Kapazität gewährleistet. Andererseits kann dem Differenzierungsschritt ein Immunglobulin-Klassenwechsel (Class Switch) vorausgehen, bei dem die B-Zelle mittels somatischer Rekombination auf einen anderen Isotypen umschaltet. In der Konsequenz entstehen Antikörper der IgA-, IgE- oder IgG-Klasse mit unterschiedlichen Eigenschaften wie z.B. Gewebegängigkeit und Halbwertszeiten.

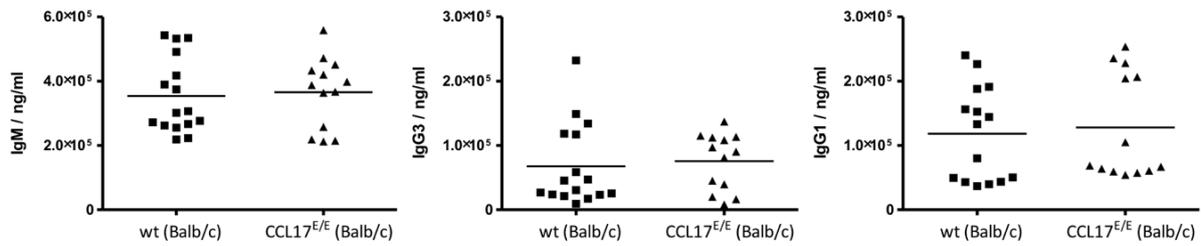
Da sich Chemokine auf das Migrationsverhalten von Zellen auswirken und für einige z.B. ein Einfluss auf das Homing-Verhalten von Lymphozyten (Forster et al., 1996; 1999) oder die Produktion von Antikörpern besteht (Ansel et al., 2002), ist eine Beteiligung von CCL17 an der Einleitung humoraler Immunantworten nicht auszuschließen und wurde bisher nicht näher untersucht.

Daher sollte in den folgenden Experimenten die Rolle von CCL17 auf die Bildung von Antikörpern sowie auf Isotypenwechsel analysiert werden. Zum einen sollten dabei CCL17-defiziente Mäuse einbezogen werden, um festzustellen, ob das Chemokin essentiell für die humorale Antwort ist. Zum anderen sollte durch den Einsatz von GalCer das Mikroklima der Milz in CCL17-profizienten Tieren gezielt so moduliert werden, dass eine Aussage darüber gemacht werden kann, ob die natürliche Abwesenheit von CCL17 in der Milz möglicherweise einen Vorteil darstellt.

#### 3.3.1. Basale Immunglobulinspiegel

In einer ersten Versuchsreihe wurden unbehandelte Wildtyp- sowie CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse auf ihre Gesamt-Immunglobulinspiegel hin mittels Serum-ELISA untersucht. Ziel war die Klärung der Fragestellung, ob sich bereits im Normalzustand durch den Mangel an CCL17 ein Defizit bei der Bildung von Immunglobulinen bzw. eine Verschiebung zwischen den einzelnen Klassen erkennen lässt.

Betrachtet wurden IgM, IgG3, IgG1, IgG2a, von denen IgM (kein Klassenwechsel), IgG3 (IFN- $\gamma$ -abhängiger Klassenwechsel) und IgG1 (IL-4-abhängiger Klassenwechsel) in Abb. 38 exemplarisch dargestellt sind:



**Abbildung 38:** Dargestellt sind die basalen Gesamt-Immunglobulinspiegel von CCL17<sup>E/E</sup>-Balb/c-Mäusen und passenden WT-Kontrollen am Beispiel von IgM, IgG3 und IgG1 (n = 11-14 Mäuse/Gruppe).

Wie die Ergebnisse zeigen, liegen die Mittelwerte der Serumtitere beider Versuchstierstämme auf einem sehr ähnlichen Niveau. Allerdings lassen sich auch innerhalb der Gruppen unterschiedliche Cluster erkennen, die sich mit unterschiedlichem Alter der Versuchstiere erklären lassen; bereits geringfügige Altersunterschiede von wenigen Wochen zeigen hier relativ starke Auswirkungen.

Berücksichtigt wurden ebenfalls Untersuchungen an Versuchstieren mit C57BL/6J- sowie C3HeB/FeJ-Hintergrund; diese führten zu ähnlichen Resultaten.

Zusammenfassend kann man ableiten, dass sich Wildtyp- und CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse nicht signifikant in ihren Immunglobulin-Blutspiegeln unterscheiden und dass die CCL17-Defizienz wahrscheinlich nicht zu einer generellen funktionellen Störung in der Produktion von Antikörpern führt.

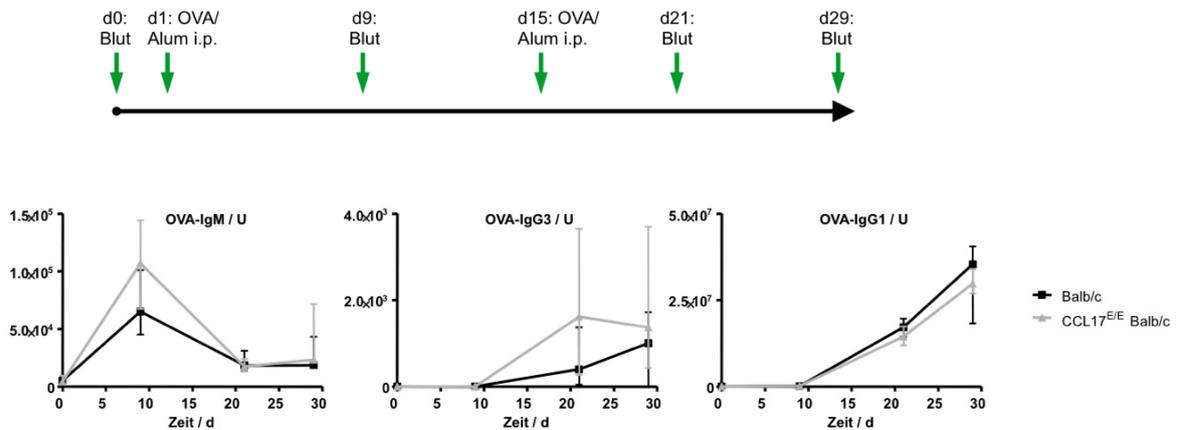
### 3.3.2. T-Helfer-abhängige humorale Immunantwort

Ein Klassenwechsel findet nach Aktivierung von B-Zellen statt und wird durch T-Helferzellen sowie Zytokine gesteuert. Essentiell neben der Erkennung von Peptid-MHC II-Komplexen auf der B-Zelle durch den T-Zell-Rezeptor ist die Interaktion zwischen CD40 auf der B-Zelle mit CD154 (CD40L) auf der Oberfläche der T-Zelle. Zusätzlich unterscheiden sich T<sub>H</sub>1- von T<sub>H</sub>2-Zellen in ihrem Zytokinprofil; die von T<sub>H</sub>1-Zellen produzierten Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TGF $\beta$  begünstigen in der Maus einen Klassenwechsel zu IgG2a, IgG2b, IgA oder IgG3, während IL-4 und IL-5, sezerniert von T<sub>H</sub>2-Zellen, IgE und IgG1 fördern.

Berücksichtigt man die eingangs beschriebene vorwiegende Expression von CCR4 auf T<sub>H</sub>2-Zellen und die häufige Assoziation von CCL17 mit T<sub>H</sub>2-Immunantworten, interessiert vor allem, ob es in CCL17-defizienten Mäusen zu einer Verschiebung von T<sub>H</sub>2- hin zu T<sub>H</sub>1-Immunglobulinklassen kommt.

Die Immunisierung mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA), einem Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, diente zur Analyse der T-Zell-abhängigen Immunreaktionen. OVA wurde in einem

ersten Experiment zweimalig im Abstand von 14 Tagen mit dem Adjuvans Alum intraperitoneal injiziert. Untersucht wurden die antigenspezifischen Titer für IgM, IgG3, IgG1 und IgG2b; dargestellt sind wiederum exemplarisch IgM, IgG3 und IgG1.



**Abbildung 39: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (I).** Dargestellt sind das Protokoll der Immunisierung sowie exemplarisch die mittels ELISA ermittelten OVA-spezifischen Immunglobulinspiegel der Klassen IgM, IgG3 und IgG1. Untersucht wurden jeweils CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse sowie passende WT-Kontrollen. Die Graphen enthalten die Mediane sowie die 0,25- und 0,75-Quartile der Titer, die für die jeweiligen Versuchstiergruppen ermittelt wurden (n = 8-10 Mäuse/Gruppe).

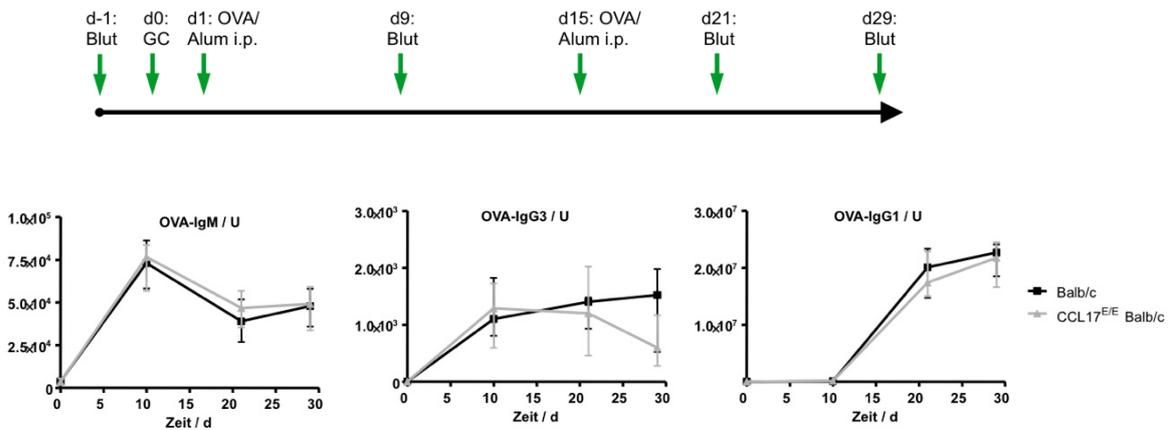
Abbildung 39 zeigt exemplarisch die gemessenen Spiegel für OVA-spezifisches IgM als initiale Antwort, sowie mit IgG3 und IgG1 jeweils einen Vertreter für von T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Zytokinen begünstigten Isotypen.

Um das Ergebnis abzusichern und etwaige Unterschiede bei dem OVA-spezifischen IgG3 auszuschließen, wurde das Experiment mit identischem Ergebnis wiederholt. Ebenfalls durchgeführt wurde das Immunisierungsprotokoll auf C57BL/6-Hintergrund; jedoch ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede.

Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass CCL17 unter physiologischen Bedingungen für die Einleitung humoraler T-Zell-abhängiger Immunantworten mechanistisch keine Rolle spielt, da sich die antigenspezifischen Titer aller gemessenen Immunglobulinklassen zwischen WT- und CCL17<sup>E/E</sup>-Mäusen nicht signifikant unterschieden.

In einem weiteren Experiment (Abb. 40) wurde die Fragestellung untersucht, ob die natürliche Abwesenheit von CCL17 in der Milz für die Einleitung solcher Immunantworten möglicherweise protektiv ist und ob die CCL17-induzierende Vorbehandlung der Mäuse mit GalCer einen Tag vor der ersten Immunisierung sich dementsprechend in CCL17-profizienten Tieren ungünstig auswirkt. Die

Gabe von OVA/Alum erfolgte wie vorab zweimalig; die Immunisierungsroute blieb unverändert. Untersucht wurden OVA-spezifisches IgM, IgG3, IgG1, IgG2a und IgG2b.



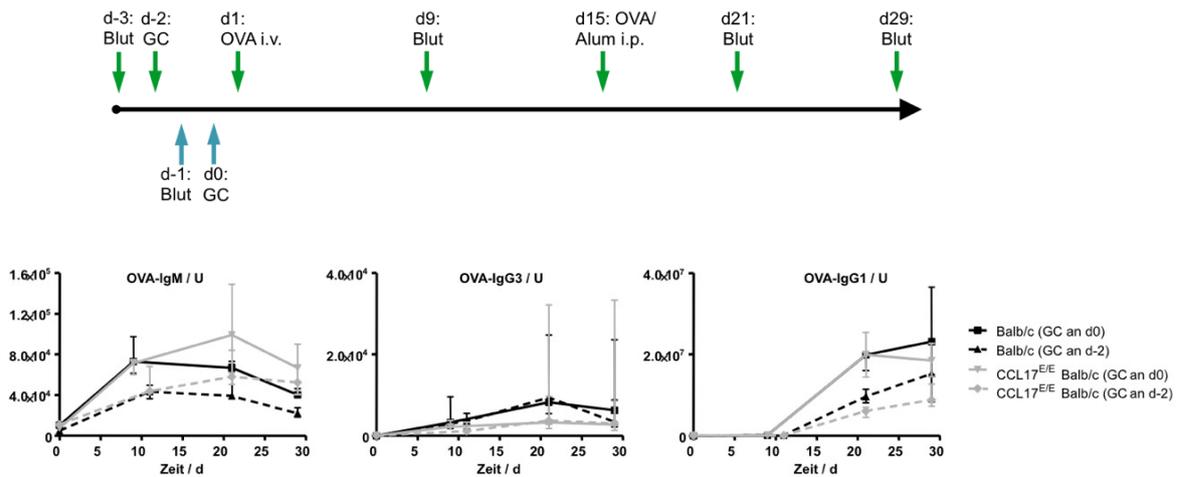
**Abbildung 40: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (II).** Die Grafik zeigt ein modifiziertes Immunisierungsprotokoll, dem eine einmalige Dosis GC an Tag 0 hinzugefügt wurde (n = 13 Mäuse/Gruppe).

Auch in diesem Modell traten keine signifikanten Unterschiede auf. Allerdings wurde bislang nur die intraperitoneale Injektion als Applikationsweg untersucht.

Deshalb sollte für ein weiteres Experiment die Injektionsroute gewechselt werden (Abb. 41). Eine i.v.-Injektion des Antigens stellt sicher, dass dieses schnell und in größerer Menge als bei i.p.-Gabe in die Milz gelangt, was sich auf die Stärke der Immunantwort auswirken kann (Fyfe et al., 1991; Daemen et al., 2004).

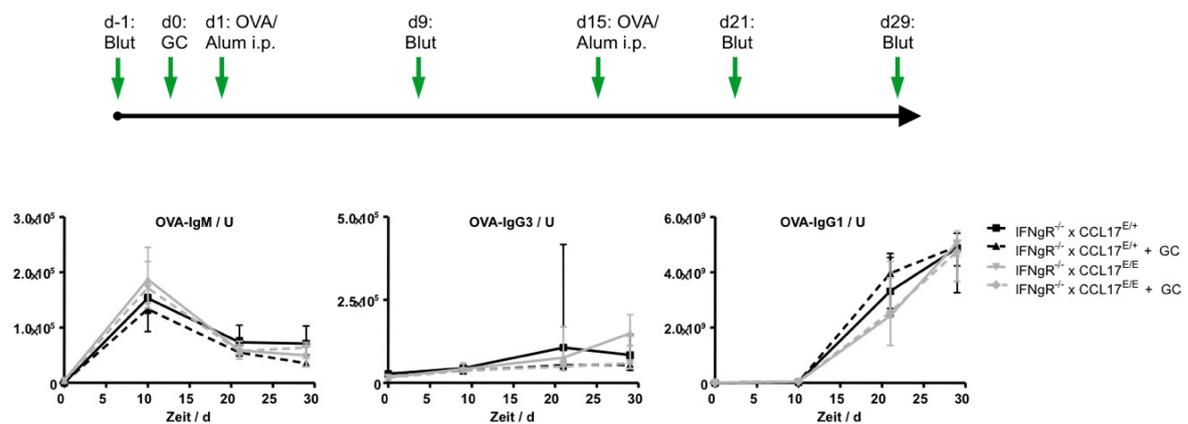
Untersucht wurden wiederum die Titer für OVA-spezifisches IgM, IgG3, IgG1, IgG2a und IgG2b; die Mäuse wurden nach zwei verschiedenen Protokollen am Tag vor (d0) bzw. drei Tage vor (d-2) der OVA-Immunisierung mit GalCer vorbehandelt.

Auch bei i.v.-Injektion des Antigens lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und CCL17<sup>E/E</sup>-Mäusen feststellen. Dagegen scheint der Zeitpunkt, zu dem die Vorbehandlung mit GalCer erfolgt, allgemein einen Einfluss auf die Immunglobulinspiegel zu haben, die bei dreitägiger Pause zwischen Vorbehandlung und OVA-Gabe teilweise geringer ausfallen:



**Abbildung 41: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (III).** In diesem Experiment erhielten CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse sowie geeignete WT-Kontrolltiere an Tag 1 das Testantigen i.v. Die Vorbehandlung mit GalCer erfolgte nach zwei verschiedenen Protokollen entweder einen oder drei Tage vor der Immunisierung (n = 3-4 Mäuse/Gruppe).

Trotz Induktion von CCL17 in der Milz in den vorherigen Experimenten blieb jedoch in den untersuchten Modellen bisher immer der gegenregulatorische IFN- $\gamma$ -Signalweg aktiv. In einem weiteren Experiment sollte dieser unterbunden werden, weswegen erneut CCL17-defiziente und -profiziente Tiere, diesmal zusätzlich ohne IFN- $\gamma$ -Rezeptor, immunisiert wurden (Abb. 42). Untersucht wurden OVA-spezifisches IgM, IgG3, und IgG1.



**Abbildung 42: Untersuchung der T-Helfer-abhängigen humoralen Immunantwort (IV).** Für dieses Experiment wurde erneut die intraperitoneale Gabe von OVA/Alum gewählt und die IFN $\gamma$ R-defizienten Versuchstiere an Tag 0 mit GalCer vorbehandelt (n = 6 Mäuse/Gruppe).

Es ist zu erkennen, dass sich erneut die Titer CCL17-profizienter und -defizienter Tiere nicht unterscheiden (Abb. 42). Dabei wirkt sich auch die Vorbehandlung mit GalCer in Kombination mit der

IFN $\gamma$ R-Defizienz und die damit verbundenen starke Induktion von CCL17 in der Milz nicht auf das Ergebnis aus.

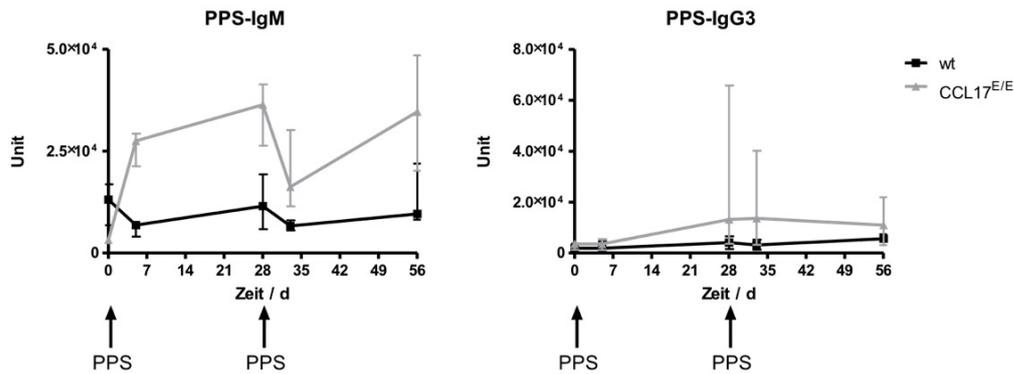
Zusammenfassend kann man aus diesem und den vorherigen Experimenten dieses Abschnittes schließen, dass es für die Ausbildung T-Zell-abhängiger humoraler Immunantworten nicht entscheidend ist, ob in der Milz CCL17 exprimiert wird oder nicht. Zusätzlich scheint CCL17 ebenfalls an der zur Einleitung einer solchen Antwort notwendigen Chemotaxis nach systemischer Antigengabe mechanistisch nicht beteiligt zu sein, da CCL17-defiziente Mäuse keine generellen Defizite aufweisen.

### **3.3.3. T-Helfer-unabhängige humorale Immunantwort**

Neben der Antwort auf Proteinantigene, die eine Beteiligung von T-Helferzellen erfordert, existieren auch andere Antigene, die eine Aktivierung von B-Zellen und Antikörpersekretion ohne vorherige Beteiligung von T-Zellen auslösen. Diese Thymus-unabhängigen (thymus-independent, TI) Antigene lassen sich in zwei Gruppen einteilen: TI-I-Antigene gehören zur Gruppe der Mitogene, die B-Zellen polyklonal aktivieren, während die TI-II-Gruppe den B-Zell-Rezeptor direkt ansprechen. In diese Gruppe fallen vor allem verschiedene Polysaccharide; ein bekannter Vertreter ist das Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid, welches es dem Erreger ermöglichen soll, sich vor Phagozyten zu schützen. Da diese Antigene nicht von T-Zellen erkannt werden, unterbleibt die Interaktion zwischen T- und B-Zelle, und somit findet kein Klassenwechsel zu anderen Isotypen statt, ausgenommen davon ist IgG3. Für diesen Isotypenwechsel ist lediglich ein IFN- $\gamma$ -haltiges Milieu notwendig, welches von T<sub>H</sub>1-Zellen produziert wird (Snapper et al., 1992). Beteiligt sind, wie eingangs beschrieben, an dieser Art von Immunreaktion vor allem B1-Zellen sowie die Marginalzonen-B-Zellen der Milz.

In einem ersten Experiment sollte nun untersucht werden, ob die generelle Abwesenheit von CCL17 einen Einfluss auf Thymus-unabhängige Immunantworten besitzt, oder ob CCL17 mechanistisch für die Einleitung nicht benötigt wird.

Immunisiert wurde zweimal im Abstand von 28 Tagen; untersucht wurden die Titer für polysaccharidspezifisches IgM sowie IgG3.



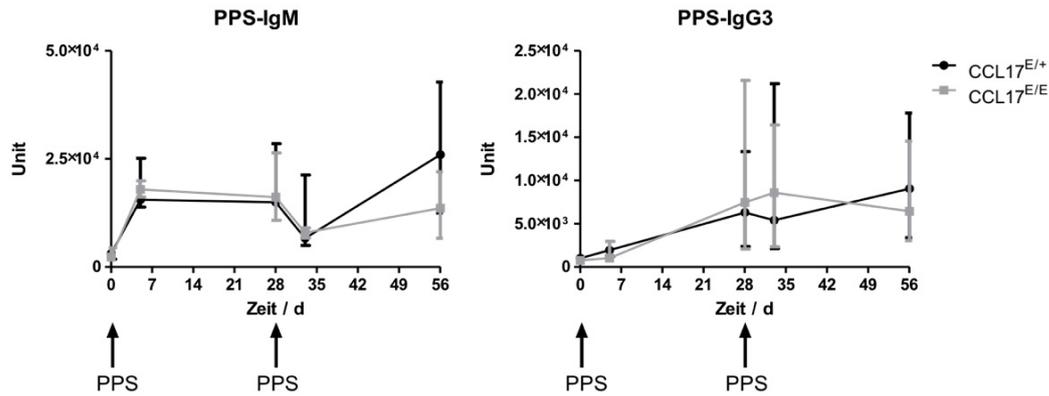
**Abbildung 43: Untersuchung der T-Helfer-unabhängigen humoralen Immunantwort (I).** Dargestellt sind die mittels ELISA ermittelten Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid-spezifischen Immunglobulinspiegel der Klassen IgM und IgG3. Die Berechnung hierbei erfolgte in relativen Units im Vergleich zu einem Standardserum, welches von immunisierten WT-Mäusen gewonnen wurde. Die Graphen enthalten die Mediane sowie die 0,25- und 0,75-Quartile der Titer, die für die jeweiligen Versuchstiergruppen ermittelt wurden ( $n = 4-5$  Mäuse/Gruppe). Untersucht wurden CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse auf Balb/c-Hintergrund sowie geeignete WT-Kontrollen.

Wie Abb. 43 zeigt, ergeben sich bereits an Tag 0 des Experiments, also vor Erstkontakt der Mäuse mit dem Antigen, unterschiedliche Titer für PPS-spezifisches IgM zwischen Balb/c-Wildtyp- und CCL17<sup>E/E</sup>-Mäusen. Dazu kommt es zu größeren Unterschieden der Antikörperspiegel im zeitlichen Verlauf für Pneumokokken-spezifisches IgM sowie IgG3. Diese Daten könnten einen Einfluss von CCL17 auf die Induktion T-Zell-unabhängiger Immunantworten nahelegen.

Um jedoch mögliche Störfaktoren auszuschließen, wurde das Experiment erneut unter der Verwendung von CCL17-defizienten Tieren sowie heterozygoten Wurfgeschwisterkontrollen wiederholt. Hiermit konnten eventuelle Unterschiede bezüglich des genetischen Hintergrunds sowie einer möglicherweise abweichenden mikrobiellen Besiedlung ausgeschlossen werden (Holmdahl and Malissen, 2012).

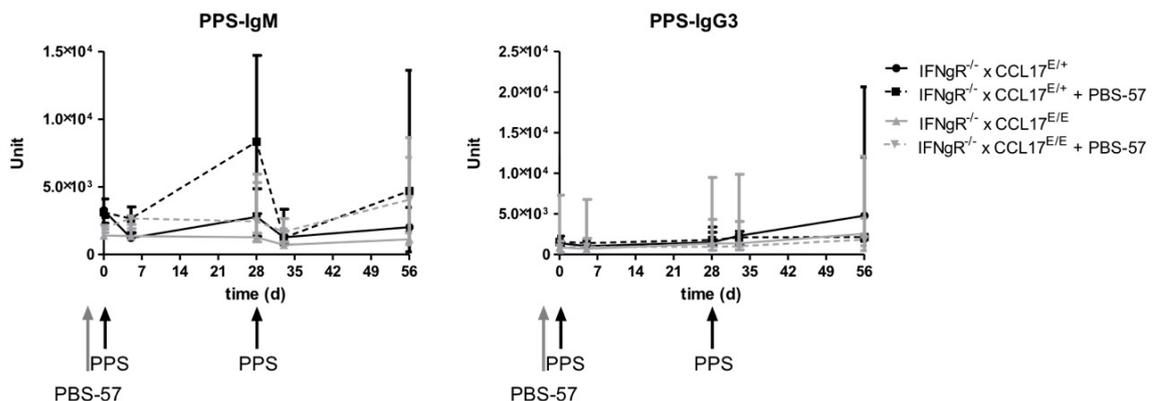
Wie Abb. 44 zeigt, tritt nun das zuerst beobachtete Phänomen der an Tag 0 erniedrigten PPS-IgM-Titer CCL17-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypen nicht länger auf. Weiterhin verlaufen die Kurven sowohl für spezifisches IgM als auch IgG3 sehr ähnlich, so dass ein Einfluss von CCL17 auf die Entwicklung einer humoralen T-Zell-unabhängigen Immunantwort unwahrscheinlich ist.

Auch eine Wiederholung des Experiments unter Vorbehandlung der Mäuse mit GalCer einen Tag vor der ersten Immunisierung führte zu ähnlichen Resultaten, die belegen, dass auch eine lokale Induktion von CCL17 in der Milz ohne Auswirkungen auf die Immunantwort bleibt.



**Abbildung 44: Untersuchung der T-Helfer-unabhängigen humoralen Immunantwort (II).** Dargestellt sind erneut die PPS-spezifischen IgM- sowie IgG3-Titer. Bei der Wiederholung des vorherigen Experiments unter identischen Bedingungen, jedoch unter Einsatz von Wurfgeschwisterkontrollen, relativieren sich die anfangs aufgetretenen Unterschiede zwischen den CCL17-defizienten und -profizienten Versuchsgruppen auf Balb/c-Hintergrund (n = 4-6 Mäuse/Gruppe).

Trotzdem sollte in einem weiteren Experiment durch die kombinierte Verwendung von GalCer mit IFN $\gamma$ R-defizienten Mäusen die CCL17-Induktion in der Milz auf ein maximales Level gebracht werden. Gleichzeitig sollte auch die Hypothese ausgetestet werden, ob das aus Kapitel 3.1.2. geschlossene T<sub>H</sub>1-orientierte Milieu in der Milz für einen Klassenwechsel zu IgG3 im Fall einer Infektion mit Thymus-unabhängigen Antigenen und somit für eine effizientere Immunantwort essentiell ist.



**Abbildung 45: Untersuchung der T-Helfer-unabhängigen humoralen Immunantwort (III).** IFN $\gamma$ R-defiziente CCL17<sup>E/+</sup>- sowie CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse wurden wie zuvor, teilweise unter Vorbehandlung mit dem GalCer-Äquivalent PBS-57, immunisiert und die PPS-spezifischen IgM- sowie IgG3-Level bestimmt (n = 5 Mäuse/Gruppe).

Auch hier sind, bis auf die Differenzen an Tag 0, welche sich wie in Abb. 43 durch das Nichtverwenden von Wurfgeschwistern erklären lassen, keine Unterschiede zwischen CCL17-

Defizienz oder -Profizienz zu beobachten, ebensowenig wie in Abhängigkeit von der GalCer-Vorbehandlung. Zusammen mit dem mit IFN $\gamma$ R-profizienten Tieren identischen Verlauf der Kurven kann daraus geschlossen werden, dass die humorale Immunantwort auf Thymus-unabhängige Antigene nicht vom veränderten Zytokinmilieu in der Milz beeinflusst wird.

### 3.4. Die Rolle von CCL17 bei der zellvermittelten Abwehr

In einem *In vivo* Zytotoxizitäts-Assay wurde die Fähigkeit zur Ausbildung einer CTL-Antwort in CCL17<sup>E/E</sup>, CCL17<sup>E/+</sup>, IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/E</sup> und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen untersucht. CTL erkennen ihnen präsentierte Antigene nur in Zusammenhang mit MHC I-Molekülen, die von nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert werden. Auch gesunde Zellen präsentieren zelleigene Peptide über MHC I, die jedoch von CTL aufgrund der vorangegangenen negativen Selektion im Thymus nicht erkannt werden. Befinden sich jedoch, z.B. im Rahmen einer viralen Infektion oder einer Tumorerkrankung, fremde Peptide im Komplex mit MHC I auf der Zelloberfläche, kommt es zur Ausschüttung von Perforinen und Granzymen durch den CTL sowie zur Fas-Ligand-medierten Apoptoseeinleitung in der Zielzelle.

Zunächst muss eine naive CD8<sup>+</sup> T-Zelle durch Bindung an dem entsprechenden Antigen-MHC I-Komplex in Kombination mit kostimulatorischen Signalen (B7-Moleküle binden an den CD28-Rezeptor der T-Zelle) durch eine professionelle APC aktiviert werden.

Damit eine APC in der Lage ist, über MHC I zu präsentieren, muss sie entweder selbst infiziert sein. In diesem Fall kommt es zur Präsentation zytosolischer Peptide (endogener Pathway) durch MHC I. Betrifft aber z.B. eine Infektion nicht die APC-Population, können exogene Peptide durch einen so genannten Kreuzpräsentations-Mechanismus internalisiert und über MHC I präsentiert werden.

Somit kann der Assay auch als Mittel zur Untersuchung der Fähigkeit der APC-Population zur Kreuzpräsentation verstanden werden. Obwohl auch B-Zellen und Makrophagen zu diesem Mechanismus fähig sind (Ramirez and Sigal, 2002; Heit et al., 2004; Schliehe et al., 2011), gelten vor allem CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC als die dahingehend wichtigste Zellpopulation (Haan et al., 2000).

Die Gruppe von Christian Kurts in Bonn veröffentlichte 2010 eine Publikation, in der die Stimulation mit GalCer die Cross-Priming-Aktivität verstärkte (Semmling et al., 2010). In CCL17- und CCR4-defizienten Mäusen fiel die Ausbildung einer CTL-Antwort dagegen geringer aus. Er wies nach, dass die GalCer-vermittelte Zytokinsekretion der NKT-Zellen in den CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC der Milz eine erhöhte CCL17-Produktion bewirkt. Durch die erhöhte Sekretion des Chemokins werden verstärkt CCR4-exprimierende naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen angelockt.

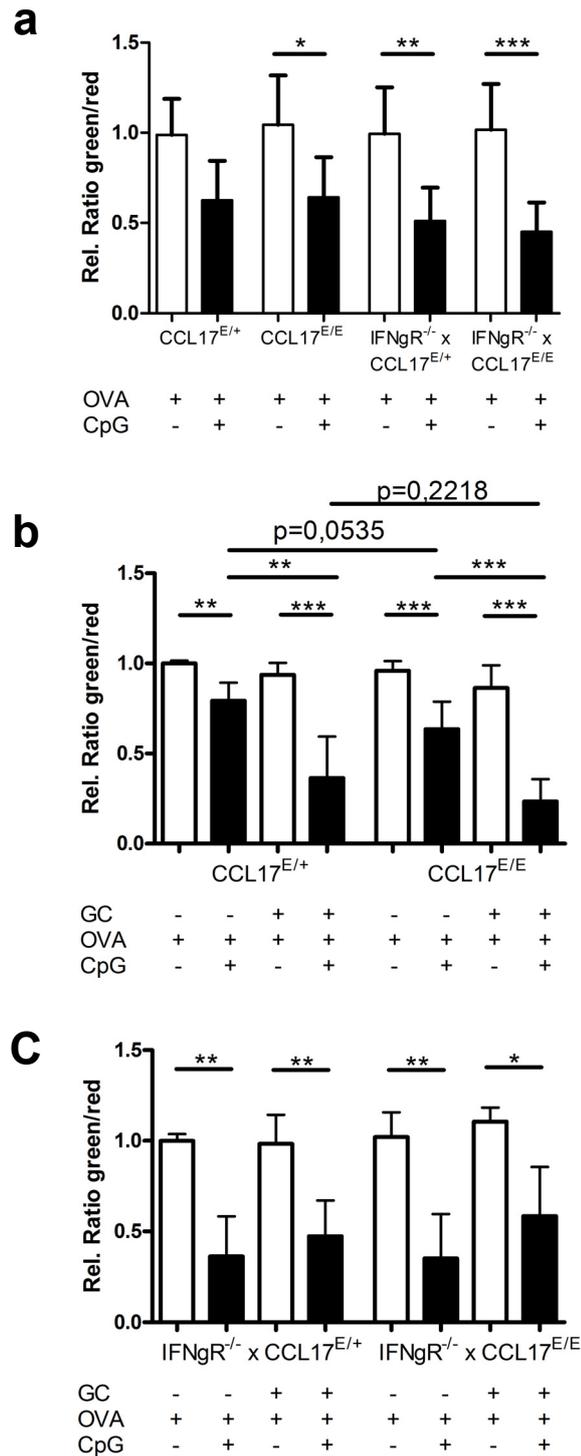


Abbildung 46: Ergebnisse der *In vivo*-Zytotoxizitäts-Assays. Für die einzelnen Experimente wurden CCL17<sup>E/+</sup>-, CCL17<sup>E/E</sup>-, IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>- bzw. IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse (siehe dazu die einzelnen Legenden) s.c. mit OVA/CpG in PBS immunisiert; Kontrollgruppen erhielten OVA in PBS. Nach einer Woche wurde den Versuchstieren eine Mischung aus grün gefärbten, mit dem OVA-Peptid SIINFEKL beladenen, und rot gefärbten unbeladenen syngenen Milzzellen i.v. injiziert. Nach weiteren 4 h wurden die Milzen entnommen und auf das Verhältnis verbliebener gefärbter Zellen hin untersucht. Dabei gibt die Ratio grüner zu roter Zellen Aufschluss über die Effizienz der Ausbildung einer CTL-Antwort: je kleiner die Ratio, desto effizienter die Zytotoxizität.

Für die in b und c dargestellten Experimente erhielten einige Tiere 24 h vor der Immunisierung eine einzelne Dosis von 2 µg GalCer (GC) i.p.

Die Graphen zeigen Daten aus zwei (a), drei (b) und zwei (c) unabhängigen Experimenten mit insgesamt 3-7 (a), 5-7 (b) und 3-5 (c) Mäusen/Gruppe.

Bei Betrachtung der Teilergebnisse lassen sich folgende Beobachtungen feststellen:

- Abb. 46b: Die Vorbehandlung der CCL17<sup>E/+</sup>- und CCL17<sup>E/E-</sup> Mäuse mit GalCer führte jeweils zu einer signifikanten Verstärkung der Zytotoxizität; diese war jedoch nicht abhängig von CCL17.
- Abb. 46c: Im Gegensatz dazu sieht man bei den IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/E-</sup> und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäusen in Abhängigkeit von GalCer keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der CTL-Antwort. Auch hier zeigte die CTL-Antwort keine Abhängigkeit von CCL17.
- Abb. 46a: Vergleicht man die CTL-Antworten aller Linien untereinander (ohne Vorbehandlung mit GalCer), findet sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom IFN $\gamma$ R.

Die Tatsache, dass in diesem Modell keine Abhängigkeit der Zytotoxizität von CCL17 gegeben ist, scheint im ersten Moment im Widerspruch zu den in Semmling et al. veröffentlichten Daten zu stehen. Jedoch bestehen zahlreiche Unterschiede in den jeweiligen experimentellen Durchführungen, auf die im Rahmen der Diskussion noch näher eingegangen werden soll und die die unterschiedlichen Resultate verständlich machen.

- Interessanterweise war in Mäusen, die zusätzlich zur CCL17-Defizienz eine IFN $\gamma$ R-Defizienz aufwiesen, die durch GalCer verursachte Zunahme der Zytotoxizität nicht mehr gegeben (Abb. 46c). Gerade hier wäre unter der Prämisse, dass CCL17 in der Milz tragender Faktor beim Cross-Priming ist, ein sehr starker Effekt zu erwarten gewesen. IFN- $\gamma$  wirkt der CCL17-Produktion in der Milz normalerweise entgegen und, wie im Abschnitt 3.2.4. gezeigt, führt die Gabe von GalCer bei IFN $\gamma$ R-Defizienz zu einer fast 50-fach verstärkten CCL17-Sekretion im Vergleich zu den profizienten Tieren.
- Vergleicht man die CTL-Antworten in IFN $\gamma$ R-profizienten mit IFN $\gamma$ R-defizienten Tieren (Abb. 46 b und c), könnte man vermuten, dass im Fall der IFN $\gamma$ R-profizienten Tiere GalCer die CTL-Antwort verstärkt, auf der anderen Seite jedoch bei den IFN $\gamma$ R-defizienten Tieren die CTL-Antwort bereits ohne GalCer ein Maximum an Effizienz erreicht hat, die durch zusätzliche GalCer-Behandlung nicht weiter gesteigert werden kann. Die Daten in Abb. 46a widersprechen dieser Beobachtung jedoch insofern, dass sich bei direkter Gegenüberstellung der IFN $\gamma$ R-defizienten und -profizienten Mauslinien die Effizienz der CTL-Antwort nicht signifikant verändert. Lediglich ein sehr leichter Trend zugunsten einer verbesserten Antwort in IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Tieren lässt sich ablesen. Diese Diskrepanz lässt sich jedoch möglicherweise dadurch erklären, dass, obwohl sich in dem zugrundeliegenden Assay Trends von Experiment zu Experiment als sehr stabil erwiesen, relativ starke Schwankungen hinsichtlich der gemessenen zytotoxischen Wirkung auftraten.

- Die Ergebnisse, dass sich unbehandelte IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>- nicht signifikant von IFN $\gamma$ R<sup>+/+</sup>-Tieren unterscheiden (a) und ausserdem GalCer-vorbehandelte IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Tiere nicht von unbehandelten (c), deuten darauf hin, dass die Zunahme der Zytotoxizität nach GalCer in den IFN $\gamma$ R<sup>+/+</sup>-Mausstämmen in Abb. 46b alternativ abhängig von IFN- $\gamma$  ist, welches bei Behandlung mit GalCer unter anderem freigesetzt wird.
- CTL-Antworten verlaufen über drei verschiedene Effektor-Signalwege: Einerseits kann die Lyse der Targetzelle durch Perforine/Granzyme induziert werden; weiterhin kann über die Bindung von Fas an seinen Liganden auf der CTL-Oberfläche eine Apoptose eingeleitet werden. Andererseits spielt aber auch die Ausschüttung von Zytokinen eine Rolle (Andersen et al., 2006). So induziert IFN- $\gamma$  in Zielzellen eine erhöhte Transkription von MHC I-Molekülen sowie Fas, und in der Konsequenz verstärkt sich die zytotoxische Wirkung der CTL (Andersen et al., 2006). Eine erhöhte Konzentration von IFN- $\gamma$  nach GalCer-Behandlung könnte demnach in IFN $\gamma$ R-profizienten Tieren CCL17-unabhängig zu einer Verstärkung der CTL-Antwort führen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass GalCer in IFN $\gamma$ R-defizienten Tieren keinen Effekt auf die CTL-Antwort zeigte, während parallel CCL17 in keinem Experiment eine Auswirkung auf die lytische Aktivität der CTL hatte.

### 3.5. CCL17 im Sepsismodell

Wie eingangs beschrieben, kommt der Milz eine wichtige Rolle in der Bekämpfung einer bakteriellen Sepsis zu. Vorrangig beteiligt sind hier einerseits Marginalzonen-B-Zellen, welche schnell und effizient große Mengen neutralisierender Antikörper sezernieren. Andererseits sind auch die dort beheimateten Makrophagen und ihre große phagozytische Kapazität von großer Wichtigkeit (Altamura et al., 2001). B1a-B-Zellen, die funktionell ähnliche Aufgaben wahrnehmen wie Marginalzonen-B-Zellen, sind zwar nicht in der Milz beheimatet; dennoch spielt das Organ für die Generierung dieser Zellpopulation eine wichtige Rolle (Wardemann et al., 2002).

Eine Studie findet ein achtfach erhöhtes Risiko splenektomierter Patienten gegenüber der Kontrollgruppe, an einer schweren Infektion mit Bakteriämie zu erkranken (Ejstrud et al., 2000). In der Regel wird hierbei *Streptococcus pneumoniae* als der hauptverantwortliche Erreger genannt (Altamura et al., 2001), in einigen Fällen kommt es jedoch auch zu Infektionen mit Enterobacteria (Ejstrud et al., 2000).

In Voruntersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob es unter dem Vollbild einer Sepsis zu einer Expression von CCL17 in den DC der Milz kommt. Zu diesem Zweck wurden CCL17<sup>E/+</sup>- sowie IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse operiert und der Verlauf der CCL17/EGFP-Expression mittels einer Kinetik mitverfolgt:

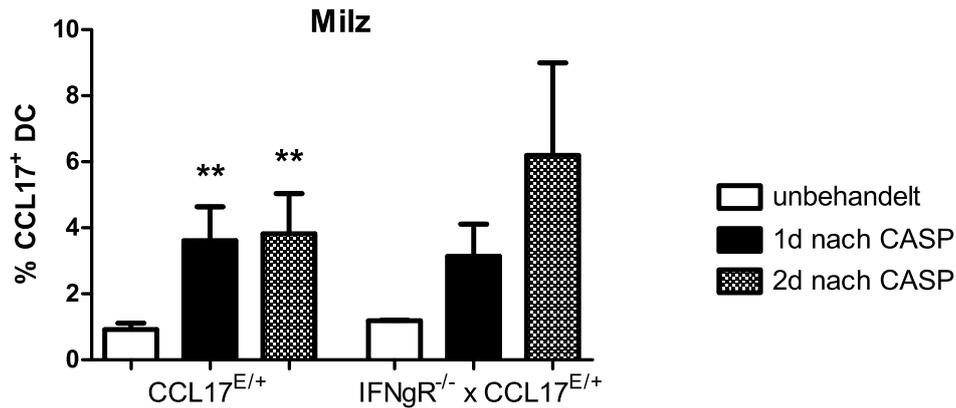


Abbildung 47: Einfluss der CASP-OP auf die CCL17/EGFP-Expression von Milz-DC. CCL17<sup>E/+</sup>- sowie IFNgR<sup>-/-</sup> x CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse wurden einer CASP-Operation mit der Stentgröße 16G unterzogen. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Milzen hinsichtlich ihrer CCL17-positiven DC analysiert und mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen (gepoolte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; n = 2-5 Mäuse/Gruppe).

Wie aus Abb. 47 ersichtlich wird, kommt es im Verlauf einer Sepsis zu einer Hochregulation von CCL17 in den DC der Milz, die ohne die gegenregulierende Komponente IFN- $\gamma$  noch leicht verstärkt wird. Damit ist die CASP mit dem TLR4-Liganden LPS in ihrem Effekt zu vergleichen; ein ähnlicher Anstieg wie nach systemischer NKT-Zell-Aktivierung mit GalCer ist jedoch nicht zu beobachten.

Trotzdem wirft dieses Vorexperiment die Frage auf, wie wichtig der beobachtete CCL17-Anstieg in der Milz für die Pathogenese der Sepsis bzw. für gegenregulatorische Mechanismen ist und ob sich ein verändertes Milieu auf die Überlebenswahrscheinlichkeit auswirkt.

Zu ihrer Beantwortung wurden CCL17-defiziente Tiere sowie Wurfgeschwister-Kontrollen CASP-Experimenten unterzogen (Holmdahl and Malissen, 2012).

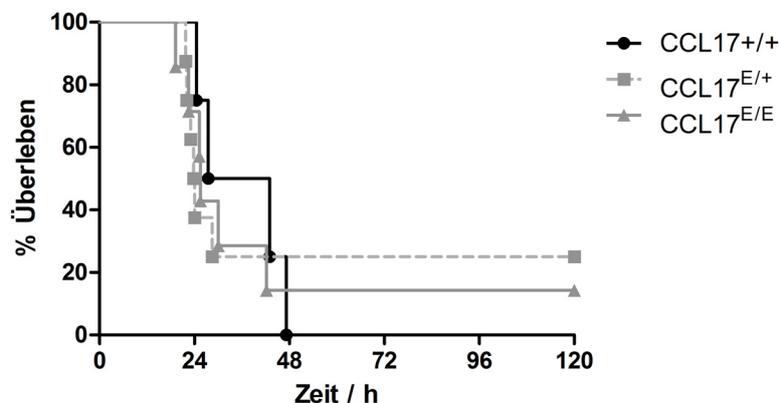


Abbildung 48: Relevanz von CCL17 für das Überleben nach CASP-OP (I). CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse sowie CCL17<sup>E/+</sup>- und CCL17<sup>+/+</sup>-Wurfgeschwister wurden einer CASP-Operation mit der Stentgröße 14G unterzogen und die Überlebenszeit bestimmt (gepoolte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; n = 4-8 Mäuse/Gruppe).

Aus den Überlebenskurven von CCL17-profizienten und -defizienten Tieren geht hervor, dass diese nahezu identisch verlaufen. Somit scheint die An- oder Abwesenheit von CCL17 in seinem physiologischen Expressionsmuster für die Pathogenese der Sepsis nicht entscheidend zu sein.

Fraglich bleibt jedoch, ob die Suppression des Chemokins in der Milz benötigt wird, um das Überleben sicherzustellen, und wie sich eine Überexpression durch GalCer auswirkt.

Fest steht, dass IFN- $\gamma$  eine wichtige Rolle zukommt: Zwar hatte die Resistenz IFN $\gamma$ R-defizienter Mäuse im LPS-Schock-Modell zuvor auf eine schädliche Rolle des Zytokins bei Sepsis hingewiesen (Car et al., 1994); jedoch konnte nun durch Anwendung des CASP-Modells gezeigt werden, dass hier ein Verlust der IFN- $\gamma$ -Wirkung zu einer erhöhten Mortalität führte und folglich IFN- $\gamma$  eine protektive Wirkung im Modell der polymikrobiellen Sepsis besitzt (Zantl et al., 1998).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass CCL17 dabei mechanistisch Bedeutung zukommt. Ein Wegfall des IFN- $\gamma$ -Signalings ermöglicht, wie zuvor gezeigt, eine einfachere CCL17-Induktion in der Milz, z.B. durch LPS. Möglich wäre daher, dass ursächlich die vergrößerte Mortalität IFN $\gamma$ R-defizienter Tiere auf überschüssige CCL17-Wirkung in der Milz zurückzuführen ist. Dazu passen würde eine Publikation, nach der CCR4-defiziente Mäuse ebenfalls im CASP-Modell eine vergrößerte Überlebenschance besitzen (Traeger et al., 2008).

Ziel der folgenden Experimente war also die Ermittlung der Rolle einer verstärkten CCL17-Expression in der Milz im Sepsis-Modell. Zu diesem Zweck wurde erneut das NKT-Zell-Stimulans zur systemischen IL-4- und GM-CSF-Induktion eingesetzt. Im Vergleich zu vorangehenden Experimenten wurde hier jedoch eine weit geringere Dosis eingesetzt als zuvor; in Literaturangaben zur Verwendung von GalCer im LPS-Schock-Modell war gezeigt worden, dass GalCer die Mortalität TNF- und IFN- $\gamma$ -abhängig stark erhöht (Ito et al., 2006), und Testexperimente im polymikrobiellen Sepsismodell hatten dieses bestätigt. Ebenfalls erforderlich war eine Reduktion des Stentdurchmessers auf 16G.

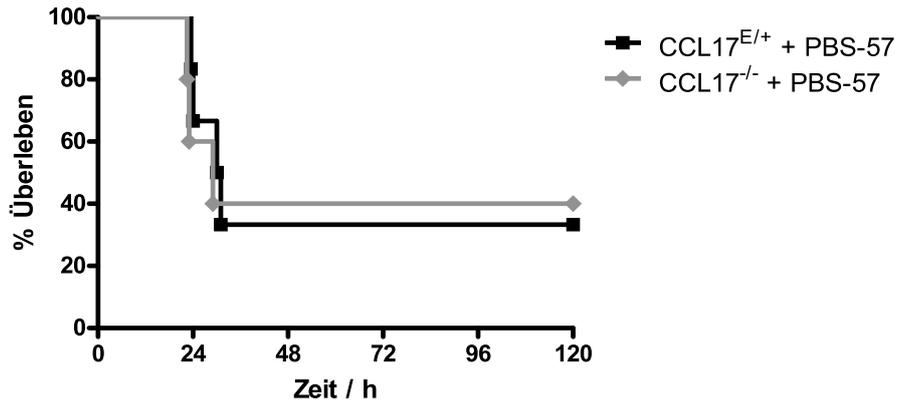


Abbildung 49: Relevanz von CCL17 für das Überleben nach CASP-OP (II) CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse sowie CCL17<sup>E/+</sup>-Mäuse wurden zunächst durch eine einmalige Injektion von 0,1 µg GalCer vorbehandelt und schließlich 24 h später einer CASP-Operation mit der Stentgröße 16G unterzogen (gepoolte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; n = 5-6 Mäuse/Gruppe).

Das Experiment zeigt, dass auch eine lokale, GalCer-vermittelte präoperative Induktion von CCL17 in der Milz keine Auswirkungen auf die Überlebenschancen hat. Somit kann geschlossen werden, dass CCL17 wahrscheinlich nicht näher mechanistisch an essentiellen immunologischen Vorgängen bei bakterieller Sepsis beteiligt ist.

In einer weiteren Experimentreihe sollte die Funktion der CCL17-produzierenden DC bei der Pathogenese der Sepsis untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden CCL17-DTR-Mäuse, die das Gen für den Diphtherietoxin-Rezeptor unter der Kontrolle des CCL17-Promoters exprimieren, einmalig mit Diphtherietoxin (DT) behandelt und 24 h später der CASP-OP unterzogen. Da Mäuse diesen Rezeptor normalerweise nicht exprimieren, können nur CCL17-produzierende DC das Toxin aufnehmen und in dieser Mauslinie spezifisch ablatiert werden. Kontrolltiere erhielten dabei kein DT, besaßen also damit noch die betreffenden Zellpopulationen.

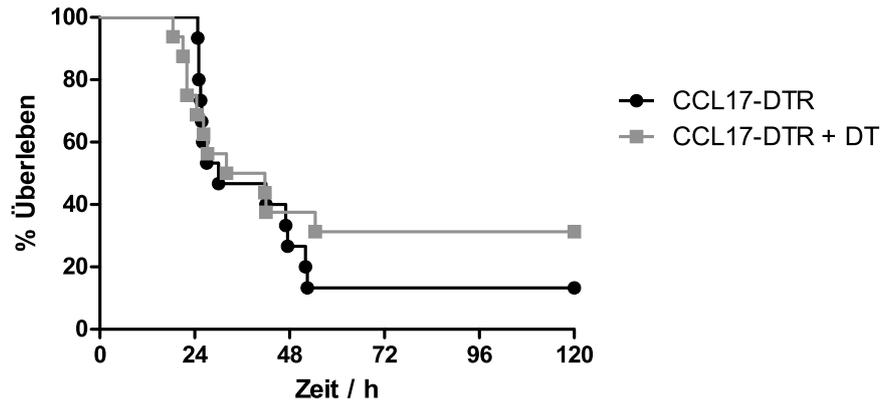


Abbildung 50: Analyse von CCL17-DTR-Mäusen mittels CASP-Modell. Der Graph zeigt die Überlebensrate von CCL17-DTR-Mäusen, die 24 h nach Injektion von DT oder PBS mit einer Stentgröße von 14G operiert wurden (gepoolte Daten aus drei unabhängigen Experimenten; n = 10-11 Mäuse/Gruppe).

Wie Abb. 50 zeigt, konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen mit DT behandelten und unbehandelten Mäusen festgestellt werden. Somit hat wahrscheinlich die Subpopulation der DC, die unter normalen Bedingungen CCL17 produziert, keine essentielle Funktion im CASP-Modell. Aufgrund der Suppression von CCL17 in der Milz sind aber die dort beheimateten DC von der Ablation nicht betroffen.

## 4. Diskussion

CCL17 ist als induzierbares Chemokin im Immunsystem an einer Vielzahl von Geschehen beteiligt. Im Mausmodell hat eine Defizienz des Chemokins Phänotypen in verschiedenen Krankheitsbildern wie AD, Wurminfektionen, Arteriosklerose und anderen zufolge, die die weitreichende Verflechtung von CCL17 widerspiegeln.

Häufige Gemeinsamkeit ist eine Beteiligung von T<sub>H</sub>2-Zellen, da CCL17 über seinen Rezeptor CCR4 vor allem diese, aber auch andere Zelltypen, anlockt bzw. stimuliert.

Durch die Analyse von CCL17-Reporter-Mäusen konnte die Produktion des Chemokins in der Maus auf dendritische Zellen zurückgeführt werden (Alferink et al., 2003). Ungewöhnlich ist jedoch das Expressionsmuster, welches dabei festgestellt wurde. Während DC in vielen Körpergeweben, vorrangig in Organen mit Kontakt zur Umwelt wie Lunge, Darm etc., aber auch LK, teils eine sehr starke Expression zeigen, fehlt das Chemokin in der Milz nahezu vollständig. Auch eine Stimulation mit gängigen CCL17-Induktoren führt hier keine nennenswerte Produktion des Chemokins herbei.

Für diese seit langem bekannte organspezifische Abwesenheit sind weder die mechanistische Ursache, noch der Grund hinsichtlich der Funktionalität immunologischer Vorgänge bekannt.

Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen unter Verwendung der oben genannten CCL17<sup>E/+</sup>-Reporterermäuse konnte in dieser Arbeit das T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN- $\gamma$  als die der Suppression zugrundeliegende mechanistische Komponente identifiziert werden sowie IL-4 und GM-CSF als die wesentlichen, für eine Hochregulation verantwortlichen Gegenspieler. Diese Beobachtungen dienten als Grundlage, das Zytokinmilieu in der Milz künstlich zu modifizieren und die Auswirkungen auf CCL17<sup>E/+</sup>- sowie auf CCL17<sup>E/E</sup>-Knockoutmäuse vergleichend zu analysieren.

### 4.1. Vergleichende Analyse der Mikroarrays von Milz- und LK-DC

Die im Rahmen dieser Dissertation vorgenommene Transkriptomanalyse sollte der Frage nachgehen, wie sich CCL17-produzierende, CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup> DC der LK von den -nicht-produzierenden DC in der Milz unterscheiden und ob diese Fähigkeit möglicherweise exemplarisch für ein weiterreichend verändertes Expressions- und somit Aufgabenmuster steht.

Die Auswertung der Array-Daten bestätigte, dass sich die beiden DC-Populationen, obwohl phänotypisch der selben Subpopulation zugehörig, in einer großen Zahl differentiell exprimierter Gene unterscheiden. Dabei fielen bereits einige interessante Gene auf (s. Tab.1):

Wie zu erwarten war, sind *Ccl17*, welches ja eins der Kriterien für den Zell-Sort darstellte, aber auch das nahe verwandte *Ccl22*, beide stark in den LK-DC überexprimiert. Diese Beobachtung passt zu Literaturangaben, die für das Chemokin CCL22 eine ähnliche Milz-spezifische Herunterregulation beschreiben wie für CCL17 (Fujita et al., 2005).

*Clu* als weiteres Beispiel codiert Clusterin, ein Glykoprotein mit weit verbreiteter Expression, und wird in den LK-DC verstärkt transkribiert. Es ist als Apolipoprotein J an der Ausbildung von Lipoproteinkomplexen beteiligt, moduliert die Komplementfunktion, und spielt bei verschiedenen Krebsformen, Alzheimer sowie beim Zelltod durch Apoptose eine Rolle; zusätzlich ist es ein stressinduziertes Chaperon (Jenne and Tschopp, 1992; Tschopp and French, 1994; Jones and Jomary, 2002; Pajak and Orzechowski, 2006; Baig et al., 2012). Man könnte also spekulieren, dass es sich bei der Hochregulation von Clusterin in den LK-DC um ein Anzeichen für stressbedingte Apoptose handelt; andererseits findet eine neue Publikation auch eine Interaktion zwischen einer Clusterinmodifikation und C-Typ-Lektin-Rezeptor DC-SIGN (Sabatte et al., 2011).

*Aldh1a2* codiert die Retinaldehyd-Dehydrogenase 2 (RALDH2), das Enzym, das die Oxidation von Retinaldehyd zu Retinsäure katalysiert. Es wird in darmassoziierten lymphatischen Geweben und somit auch den gesorteten mesenterialen LK unter anderem von CD103<sup>+</sup> DC produziert (Iwata, 2009; Iwata and Yokota, 2011) und spielt eine Rolle in der extrathymischen Generierung von regulatorischen T-Zellen (Sun et al., 2007). CD103, welches auch als Integrin  $\alpha E$ , *itgae*, bekannt ist, befindet sich ebenfalls unter den in LK-DC stark überrepräsentierten Transkripten.

Bei der Gruppe der Aquaporine handelt es sich um Wasserkanal-Proteine, die in der Zellmembran verankert sind und eine Rolle in vielen physiologischen Vorgängen spielen, bei denen Wasser in bzw. durch Zellen transportiert wird. Aquaporin 9 (*Aqp9*) zählt strukturell zusammen mit *Aqp3* und *Aqp7* zu der dem bakteriellen Glycerol-Facilitator ähnelnden Subgruppe der Aquaglyceroporine. Da beide letztgenannten Aquaporine vorwiegend in unreifen DC exprimiert sind, werden sie auch in Verbindung mit dem Vorgang der Makropinozytose gebracht; dagegen scheint *Aqp9* in reifen und unreifen DC sowie Monozyten und Makrophagen gleichermaßen stark vertreten zu sein (de Baey and Lanzavecchia, 2000). *Aqp9*-defiziente Mäuse zeigen eine Beeinträchtigung des Glycerolstoffwechsels; zusätzlich scheint aus dem Verlust des Aquaporins in Erythrozyten ein Überlebensvorteil der Tiere bei Malariainfektionen zu resultieren (Liu et al., 2007b). Mit einer fast zwanzigfach stärkeren Transkription in den LK handelt es sich bei *Aqp9* um eines der stärksten regulierten Gene.

Bei dem Arylhydrocarbonrezeptor-Repressor, AhRR, handelt es sich um einen Antagonisten des Transkriptionsfaktors AhR. Letzterer reguliert viele Gene, die meist Funktionen innerhalb des Fremdstoffwechsels, aber auch der Immunabwehr ausüben, wie z.B. diverse Cytochrome (u.a.

CYP1A1, CYP1A2), Zytokine (z.B. IL-6) und Enzyme wie ADH-3 und GST Ya (Jensen et al., 2003; Crawford et al., 2004; Wu et al., 2006; Esser et al., 2009). Der AhRR wiederum ist in der Lage, AhR-abhängige Signalwege zu supprimieren. Die Daten aus dem Array zeigen, dass *Ahrr* in der Milz vermindert transkribiert wird. Experimente aus unserer Arbeitsgruppe konnten mittlerweile die Abwesenheit des AhRR in der Milz unter Verwendung von AhRR/EGFP-Reportermausen bestätigen. Aus welchem Grund eine Suppression des AhRR in der Milz auftritt, ist allerdings noch unklar. Eine ähnliche Suppression des AhRR konnte für die Leber gezeigt werden, die als Entgiftungsorgan eine Vielzahl von Cytochromen für die Phase I-Reaktionen von Substanzen aller Art benötigt und für die eine verminderte Expression des AhR hinderlich wäre.

Bei den auf Seiten der Milz-DC vergleichsweise überexprimierten *Tlr7* und *Nod1* handelt es sich um Gene von Mitgliedern der PRRs (*Pathogen-recognition receptors*). NOD1 als intrazellulärer NOD-like Rezeptor erkennt meso-Diaminopimelinsäure, ein Bestandteil bakterieller Peptidoglykane, bei TLR7 handelt es sich um einen ebenfalls intrazellulären Rezeptor für einsträngige RNA-Moleküle (ss-RNA) mit einer Rolle bei der Detektion von RNA-Viren wie z.B. Influenza (Akira and Hemmi, 2003; Hemmi and Akira, 2005). Innerhalb der Milz-DC wird TLR7 sowohl von pDC als auch von konventionellen DC exprimiert, jedoch mit Ausnahme der aussortierten CD8 $\alpha^+$  DC (Edwards et al., 2003; Naik et al., 2005). Dagegen existieren Hinweise, dass zumindest in Ratten intestinale DC keinen TLR7 besitzen (Yrlid et al., 2006), was zu den Arraydaten passen würde.

NOD1 wird, wie auch NOD2, weitestgehend von APC sowie Epithelzellen exprimiert (Inohara and Núñez, 2003); beide werden häufig mit der gastrointestinalen Immunabwehr in Verbindung gebracht in Zusammenhängen wie Helicobacter- oder Salmonella-Infektionen (Le Bourhis et al., 2009; Watanabe et al., 2010). Ähnlich wie für TLR7 existieren auch für NOD1 Daten, die eine Expression innerhalb der konventionellen Milz-DC nicht von CD8 $\alpha^+$ , jedoch von allen übrigen DC nachweisen (Luber et al., 2010).

Die Auswertung hinsichtlich funktioneller Muster mit Hilfe von Online-Datenbanken brachte in der Milz Häufungen in den Bereichen Toll-Like-Rezeptor-, RIG-I-like-Rezeptor- und NOD-like-Rezeptor-Signaling zu Tage. Umgekehrt waren viele Gene, die in den LK-DC verhältnismäßig überrepräsentiert vorlagen, weniger immunologischen, als vielmehr physiologischen Funktionen zugeordnet; z.B. traten Gene auf, die aus dem Bereich des Kohlenhydrate-Metabolismus, der Terpenoid-Synthese oder der Regulation des Zytoskeletts bekannt sind.

Auf beiden Seiten stark vertreten waren viele Gene aus dem Bereich des Chemokin- sowie des Zytokin-Signaling. Zusätzlich vermittelte das Chemokinprofil von Milz- und LK-DC den Eindruck eines eher T<sub>H</sub>2-nahen Klimas in den LK, während das Milieu in der Milz eher T<sub>H</sub>1-assoziiert ist. Diese

Tatsache wurde ebenfalls durch eine große Zahl IFN- $\gamma$ -abhängiger Gene unterstrichen, die in der Milz überrepräsentiert vorlagen, darunter auch der IFN $\gamma$ R. Eine verstärkte Expression dieses Rezeptors konnte durchflusszytometrisch auch auf Proteinebene bestätigt werden und bildete die Grundlage für weiterführende Experimente hinsichtlich der Regulation von CCL17.

## 4.2. Untersuchung der Regulation von CCL17 in Milz-DC

Wie bereits erwähnt, war die milzspezifische Abwesenheit des Chemokins CCL17 lange eine Tatsache, für deren Ursache und Mechanismus keine Erklärung vorlag.

Die kürzlich präsentierten Ergebnisse der Gruppe von Christian Kurts brachten erstmals CCL17 in der Milz in einen Kontext mit Kreuzpräsentation, was einen Erklärungsansatz für diese Beobachtung bot (Semmling et al., 2010).

In einem klassischen Kreuzpräsentations-Szenario führt die Begegnung einer lizenzgebenden antigenspezifischen T<sub>H</sub>-Zelle und einer kreuzpräsentierenden DC zur Sezernierung von CCL3 und CCL4 und somit zur Attraktion naiver, CCR5-exprimierender CTL.

In dem neu entdeckten alternativen Mechanismus dagegen wird die Lizenzgebung durch aktivierte NKT-Zellen übernommen (Bouso and Albert, 2010). Die DC sezerniert daraufhin CCL17 und zieht CCR4<sup>+</sup>, naive CTL an. Wie beschrieben, sind normalerweise CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC die Hauptquelle für CCL17 in der Maus (Alferink et al., 2003). Andererseits sind ja CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC zur Kreuzpräsentation befähigt (Haan et al., 2000), und diese Subpopulation ist es auch, die zusätzlich zu den CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC unter den experimentellen Voraussetzungen in der Publikation von Semmling et al. die Fähigkeit zur CCL17-Sekretion erlangt.

Betrachtet man die zahlreichen Aufgaben der Milz, was ihre Rolle als Blutfilter angeht, der zwischen harmlosen, körpereigenen Bestandteilen und Pathogenen unterscheiden und adäquat durch Einleiten von Immunreaktionen oder Toleranz reagieren muss, ergibt sich die Hypothese, ob eine unter normalen Bedingungen supprimierte CCL17-Produktion einen Mechanismus darstellt, der Autoreaktivität minimieren soll. Ein dauerhaft erhöhtes CCL17-Level in der Milz könnte möglicherweise verstärkte Anlockung von CTL und somit die Einleitung zytotoxischer T-Zell-Immunreaktionen zur Folge haben. Dabei könnte jedoch gleichzeitig auch die Direktionalität der Migration beeinträchtigt sein, da für eine effiziente Chemotaxis ein Gradient erforderlich ist.

Auf der anderen Seite kann man jedoch auch spekulieren, dass die Konsequenz einer konstitutiven CCL17-Expression in eine andere Richtung, nämlich die einer auftretenden Chemokintoleranz, ginge. Unter dieser Prämisse würde eine kontinuierliche Exposition des Chemokinrezeptors CCR4 mit

seinem Liganden CCL17 möglicherweise eine Rezeptor-Desensitierung zur Folge haben. Durch Rezeptor-Herunterregulation, -Phosphorylierung oder intrazelluläre Sequestrierung des Rezeptors würden die CCR4-exprimierenden Zelle auf diese kontinuierliche Stimulation reagieren, und somit vermutlich im akuten Fall einer Infektion nicht stark genug reagieren können.

Somit stellt sich die Frage, wie und unter welchen Umständen im Gegenzug Milz-DC die Fähigkeit zur CCL17-Produktion erlangen bzw. erlangen sollen. NKT-Zell-Stimulation führt zu einer breiten Ausschüttung verschiedener Zytokine, unter anderem IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, GM-CSF, TNF $\alpha$  und IL-22 (Coquet et al., 2007; 2008; Goto et al., 2009).

Auf der anderen Seite wurden bereits zahlreiche Zytokine in einen Kontext mit CCL17 gebracht. Wie eingangs beschrieben, besitzen verschiedenen Publikationen nach sowohl IL-4, IL-10, IL-13, TNF $\alpha$  als auch GM-CSF einen positiven Einfluss auf die CCL17-Produktion (Vestergaard et al., 2000; 2001; Nomura et al., 2002; Yu et al., 2002b; Faffe et al., 2003; Xiao et al., 2003a). Auf der anderen Seite supprimierte IFN- $\gamma$  in epidermalen Langerhans-Zellen CCL17 – besaß aber gleichzeitig auf HaCaT-Zellen eine CCL17-induzierende Wirkung (Xiao et al., 2003a).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Produktion von CCL17 in murinen Milz-DC durch IFN- $\gamma$  unterbunden wird, und zwar so effektiv, dass selbst eine Stimulation mit TLR-Liganden dieser Suppression kaum entgegenwirken kann (Alferink et al., 2003). Indem dieser Regulationsmechanismus durch das Einkreuzen von IFN $\gamma$ R-defizienten Mäusen gezielt ausgeschaltet wurde, zeigte sich erstmals ein sichtbarer Effekt stimulatorischer Maßnahmen in Form einer messbaren CCL17-Produktion. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass die Zytokine IL-4 und GM-CSF, die z.B. durch die Behandlung mit dem NKT-Zell-Stimulans GalCer in großen Mengen freigesetzt werden, in Milz-DC einzeln oder gemeinsam eine CCL17-Sekretion induzieren können und so dem IFN- $\gamma$ -Effekt entgegenwirken.

Interessanterweise wurden vor kurzem Daten publiziert, die einen Zusammenhang zwischen GM-CSF und Kreuzpräsentation untersuchten (Zhan et al., 2011). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass CD8<sup>+</sup> Milz-DC von GM-CSF-überexprimierenden Mäusen denen von Wildtyp-, und besonders GM-CSF-defizienten Mäusen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation überlegen waren. Im Hinblick auf unsere Daten und die der Gruppe von Kurts scheint ein Signalweg, bei dem GM-CSF CCL17 induziert und somit die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens von DC und CTL erhöht, sehr plausibel und naheliegend.

---

Nicht vollständig geklärt bleibt vorerst die Frage, durch welchen Mechanismus IFN- $\gamma$  die CCL17-Suppression in der Milz bewirkt.

IFN- $\gamma$  vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über den intrazellulären JAK-STAT-Signaltransduktionsweg, wobei in der Regel STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1) aktiviert wird (Hu and Ivashkiv, 2009). Ein weiterer wesentlicher Bestandteil ist jedoch ebenfalls die Kreuzregulation zellulärer Signalkaskaden auf andere Zytokineinflüsse hin.

Mediatoren dieser Regulationsmechanismen stellen Proteine der SOCS-Familie (Suppressor of cytokine signaling) dar. Bei diesen Proteinen handelt es sich um durch Zytokine induzierbare negative Regulatoren der Zytokin-Signalkaskaden. Sie werden ebenfalls als STAT-induzierte STAT-Inhibitoren (STAT-induced STAT inhibitors, SSI) bezeichnet.

In primären humanen Monozyten verhindert die Behandlung mit IFN- $\beta$  oder IFN- $\gamma$  die Aktivierung von STAT6 durch IL-4 sowie die STAT6-abhängige Genexpression zumindest teilweise über die Induktion von SOCS-1 (Dickensheets et al., 1999). Venkatamaran et al. führen die IFN- $\gamma$ -medierte Suppression der IL-4-induzierten Genexpression mechanistisch auf eine Blockade der STAT6-Phosphorylierung zurück (Venkataraman et al., 1999).

Durch eine Überexpression von SOCS-1 bzw. SOCS-3 in HEK293-Zellen kann die IL-4-medierte Genexpression von CCL26 unterbunden werden, indem die SOCS-Proteine die Bindung von STAT-6 an ein responsives Element im CCL26-Promoter blockieren (Hebenstreit et al., 2005).

In einer aktuellen Publikation aus dem Jahr 2011 konnte sogar erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen einer Überexpression von SOCS-1 in der Retina von Mäusen und Ratten und dem Ausbleiben einer CCL17-Hochregulation im Uveitis-Modell hergestellt werden (Yu et al., 2011).

Vor diesem Hintergrund erscheint die Hypothese, dass das T<sub>H</sub>1- und somit IFN- $\gamma$ -nahe Milieu in der Milz für eine erhöhte Expression von SOCS-1 sorgt, logisch. Dieses könnte dann wiederum zu einer Inhibition der IL-4-medierten STAT6-Aktivierung führen und somit eine die CCL17-Produktion stimulierende Bindung an STAT6-Bindestellen im CCL17-Promoter verhindern.

Somit würde man an dieser Stelle in den Arraydaten die differentielle Transkription des Gens für SOCS-1 zwischen Milz- und LK-DC erwarten. Interessanterweise ist es jedoch SOCS-3, welches in der Liste der Ergebnisse als um den Faktor 2,9 in der Milz erhöht auftaucht. Auch für dieses Protein wurde bereits eine Induzierbarkeit durch IFN- $\gamma$  beschrieben (Gatto et al., 2004).

Klarheit über die Rolle der SOCS-Proteine dürften Untersuchungen von Milz-DC bei gleichzeitiger SOCS-1- bzw. -3-Defizienz in DC bringen, wie sie durch die Kreuzung der SOCS-1<sup>lox/lox</sup>- bzw. -3<sup>lox/lox</sup>-Cre-Linien mit CD11c-Cre-Mäusen (Yasukawa et al., 2003; Caton et al., 2007; Hashimoto et al., 2011) erhalten werden könnten. Die Untersuchung von SOCS-1<sup>-/-</sup>-bzw. -3<sup>-/-</sup>-Mäusen ist aufgrund der Lethalität der Phänotypen leider nicht möglich (Starr et al., 1998; Marine et al., 1999). Eine Alternative wäre auch die Untersuchung der bereits publizierten jeweiligen Kreuzungen mit LysM-Cre-Mäusen, bei denen eine partielle Deletion auch in DC gezeigt wurde bzw. zu erwarten ist (Yasukawa et al., 2003; Chong et al., 2005).

Schlussendlich bleibt jedoch auch die Möglichkeit eines vollständig SOCS-unabhängigen Mechanismus der CCL17-Suppression. Huang et al. schlossen aus der Tatsache, dass die IFN- $\gamma$ -bedingte Inhibition der STAT6-Phosphorylierung in T<sub>H</sub>1-Zellen Tage benötigt, ein SOCS-abhängiger Mechanismus jedoch nur Stunden, dass ein weiterer Signalweg existieren muss (Huang et al., 2005)).

Ebenfalls über einen SOCS-medierten Mechanismus könnte die Gegenregulation nach GalCer-Gabe stattfinden, die verhindert, dass die zunächst CCL17-exprimierenden DC nach mehrfacher Injektion weiterhin das Chemokin produzieren. Bei wiederholter Gabe des NKT-Stimulans war eine geringere Frequenz CCL17-positiver DC beobachtet worden als nach nur einer einzigen Dosis.

Bereits 2006 stellten Wirnsberger et al. (Wirnsberger et al., 2006) die Hypothese auf, dass SOCS-Proteine an gegenregulatorischen Mechanismen nach IL-4-induzierter CCL17-Hochregulation beteiligt sein könnten.

Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass SOCS-Proteine in die Regulation von CCL17 mechanistisch involviert sind. Diese Proteinfamilie bietet somit einen interessanten Ansatz für weiterführende Untersuchungen.

### **4.3. Die physiologische Rolle der CCL17-Suppression in der Milz**

Wie die Untersuchungen zur Regulation von CCL17 in den DC der Milz zeigten, wird dort durch ein T<sub>H</sub>1-nahes Milieu gewährleistet, dass unter normalen Bedingungen CCL17 nicht detektierbar ist und es lediglich zu einer Hochregulation kommt, wenn induzierende Zytokine wie IL-4 und/oder GM-CSF in größeren Mengen ausgeschüttet werden.

Hinsichtlich dieser organspezifischen Suppression, die so rigoros in keinem anderen Organ aufzufinden ist, stellt sich die Frage der biologischen Relevanz dieser Beobachtung. Viele der

komplexen Vorgänge in der Milz werden unter Mithilfe von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren umgesetzt. Die Sezernierung von CXCL13 mediert z.B. die Attraktion von B-Zellen in die Follikel via CXCR5 (Forster et al., 1996). Eine Beteiligung von CCL21 über CCR7 an der Rekrutierung von T-Zellen in die T-Zell-Zonen, ohne die es zur Dislokation der T-Zellen und daraus resultierenden verzögerten T-Zell-Antworten kommt, wurde ebenso bewiesen (Forster et al., 1999; Mori et al., 2001).

Um den Einfluss von CCL17 auf Immunantworten der Milz zu testen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *in vivo*-Modelle etabliert und angewandt. Diese hatten zum Ziel, in verschiedenen Szenarien, in denen eine Beteiligung der Milz zu erwarten war, die Rolle von CCL17 im Allgemeinen und darüberhinaus den Einfluss einer lokalen Induktion in der Milz zu untersuchen.

#### **4.3.1. Analyse der Daten aus dem Sepsismodell**

Als Modell einer humanen polymikrobiellen Sepsis, wie sie z.B. nach Operationen auftreten kann, wurde in dieser Arbeit das CASP-Modell eingesetzt. Hierbei wird operativ ein septischer Fokus gesetzt, der den Austritt von intestinaler Flora in den Peritonealraum ermöglicht. Aufgrund einer erhöhten Mortalität unter splenektomierten Patienten wird allgemein von einer wichtigen Bedeutung der milzbeheimateten Zellpopulationen bei der Abwehr systemischer bakterieller Infektionen ausgegangen.

Eine Beteiligung von CCL17 bzw. CCL17-produzierenden DC wurde vorab aus mehreren Gründen postuliert: Eine Publikation untersuchte die Bedeutung von DC für die septische Pathogenese mit Hilfe von Mäusen, deren DC mittels Expression des Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR) unter Kontrolle des CD11c-Promoters durch die Gabe von Diphtherietoxin (DT) ablatierbar waren. Im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zeigten Tiere nach Behandlung mit DT eine signifikant verstärkte Mortalität, allerdings in einem anderen Sepsismodell (*cecal ligation and puncture*) (Scumpia et al., 2005).

Desweiteren ist für IFN $\gamma$ R-defiziente Tiere schon seit langem bekannt, dass diese eine erhöhte Sterblichkeitsrate nach CASP aufweisen (Zantl et al., 1998). Ebenfalls ist beschrieben worden, dass CCR4-defiziente Mäuse WT-Mäusen gegenüber eine signifikant verbesserte Überlebensrate im CASP-Modell besitzen (Traeger et al., 2008). Beides zusammengenommen könnte in eine Hypothese passen, dass CCL17 als inflammatorisches Chemokin zu einer überschießenden inflammatorischen Immunantwort beiträgt und somit die Pathogenese eher verstärkt, und ein Ausschalten dieser Komponente die Überlebenswahrscheinlichkeit verbessert.

Dem widerspricht jedoch die in dieser Arbeit ermittelte Datenlage. Hier zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Überlebenszeit beim Vergleich von CCL17-defizienten mit -profizienten Mäusen,

weder im Normalzustand noch nach vorangegangener Induktion von CCL17 in der Milz mittels GalCer. Auch eine Ablation der CCL17-produzierenden DC-Population führte zu keiner statistisch signifikanten Verschiebung der Mortalitätsrate. Somit scheint CCL17 bei der CASP-induzierten Sepsis keine entscheidende Rolle zu spielen.

Dass DC, insbesondere Milz-DC, eine wichtige Rolle für das Modell spielen, ist unstrittig. Möglicherweise geht allerdings die in der Publikation von Scumpia et al. ermittelte Abhängigkeit der Überlebensrate vom Vorhandensein der DC ursächlich auf andere Subpopulationen zurück. In ihren Experimenten waren ja alle Populationen vorab ablatiert worden. Wird der Rezeptor stattdessen unter Kontrolle des CCL17-Promoters exprimiert, sind von der Ablation weitestgehend nur die CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC-Populationen betroffen. Diese scheinen nach den Erkenntnissen, die aus dem in dieser Arbeit durchgeführten entsprechenden CASP-Experiment gewonnen wurden, jedoch nicht für das Überleben entscheidend zu sein.

Im CLP-Modell wurde im Verlauf der Sepsis ein selektiver Verlust CD8<sup>+</sup> sowie CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Milz-DC publiziert, von dem CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> DC nicht betroffen waren (Flohé et al., 2006). Darüber spekulieren die Autoren, dass es bei den betroffenen DC möglicherweise zur Apoptose kommt und dieser Weg eine Möglichkeit zur Regulation der Immunantwort darstellt. Die CCL17-produzierenden DC gehören jedoch weitestgehend der letztgenannten Population an, die von diesem postulierten Mechanismus ohnehin nicht betroffen sind; zusätzlich wäre für eine Ablation der betreffenden Milz-DC eine Vorbehandlung mit GalCer notwendig gewesen, die bisher nicht durchgeführt wurde.

Schließlich besteht ein weiterer Unterschied jedoch auch in der Verwendung des CLP-Modells selbst; es hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass sich Ergebnisse, die mit Hilfe des einen der beiden Modelle gewonnen wurden, nicht immer auf das andere Modell übertragen lassen, wie die Resultate für die Bedeutung von TNF $\alpha$  belegen (Echtenacher et al., 1990; Zantl et al., 1998).

Als Kritikpunkt an der CCR4-betreffenden Publikation kann man anführen, dass hier keine Wurfgeschwister-Kontrollen verwendet worden sind. Stattdessen wurden Wildtyp-Kontrollen kommerziell bezogen. Heute ist bekannt, dass Unterschiede in der Darmflora beispielsweise die Zusammensetzung der T-Zell-Populationen hinsichtlich der verschiedenen Subsets T<sub>H</sub>17 und Tregs beeinflussen, und somit unterschiedliche Haltungsbedingungen und Hygienestandards der Versuchstiere das Ergebnis mitbeeinflussen (Ivanov et al., 2008). Ebenfalls spielen Polymorphismen und Mutationen eine Rolle (Stevens et al., 2007). Somit wurden für die in dieser Dissertation durchgeführten *in vivo*-Experimente weitestgehend und sofern möglich Wurfgeschwister-Kontrollen eingesetzt.

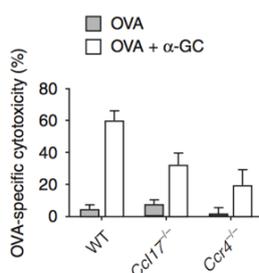
Dieser Standard wurde auch bei Zantl et al. eingehalten; jedoch übt IFN- $\gamma$  auf das Immunsystem eine Vielzahl von Einflüssen aus, so dass die dort publizierte Diskrepanz in der Mortalität zwischen

IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>- und IFN $\gamma$ <sup>+/-</sup>-Tieren nicht zwangsläufig auf dem Einfluss auf die CCL17-Transkription beruhen muss.

Zu guter Letzt lässt sich auch anführen, dass CCR4, wie eingangs vorgestellt, Rezeptor für sowohl CCL17 als auch CCL22 ist. Für dieses Chemokin ist, ähnlich wie für CCL17, eine milzspezifische verminderte Expression beschrieben worden, die in dieser Arbeit durch eine Genexpressionsanalyse zwischen Milz- und LK-DC sowie ELISA-Daten von *ex vivo*-DC-Kulturen bestätigt werden konnte (Fujita et al., 2005). Auch scheint CCL22 ebenfalls durch IFN- $\gamma$  supprimiert zu werden, wenn auch bei weitem nicht in demselben Ausmaß wie CCL17. Dementsprechend könnte man auch die Hypothese aufstellen, dass der bei den CCR4-defizienten Tieren aufgetretene Effekt sich auf eine nichtredundante Funktion von CCL22 begründet. In diesem Fall wäre keinerlei Auswirkung einer CCL17-Defizienz zu erwarten, und die Daten von Zantl et al. würden wiederum ins Bild passen (Zantl et al., 1998). Klarheit darüber dürfte in der Zukunft eine CCL22<sup>-/-</sup>-Maus bringen, die aktuell in Bonn von der Gruppe von Christian Kurts generiert wird.

#### 4.3.2. Ergebnisse des *In vivo*-Zytotoxizitäts-Assays und Gegenüberstellung mit Literaturdaten

Für die Untersuchung der Bedeutung von CCL17 in zellvermittelten zytotoxischen Immunreaktionen wurde ein *In vivo*-Zytotoxizitäts-Modell in CCL17-profizienten und -defizienten Mäusen durchgeführt. Die Untersuchung konnte zwar IFN- $\gamma$ -abhängig eine verbesserte Zelllyse nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit GalCer bestätigen (Fujii et al., 2003) (s. Abb. 46). Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der CCL17<sup>E/+</sup>- und CCL17<sup>E/E</sup>-Linie festgestellt werden, auch nicht bei zusätzlicher IFN $\gamma$ -Defizienz. Damit weichen die Ergebnisse auf den ersten Blick von den in Semmling et al. publizierten Daten der Gruppe von Christian Kurts ab (Semmling et al., 2010). Diese hatten eine Abhängigkeit zellvermittelter Zytotoxizität nach GalCer von CCL17 publiziert und CCL17 als integralen Bestandteil eines alternativen Kreuzpräsentations-Mechanismus identifiziert:



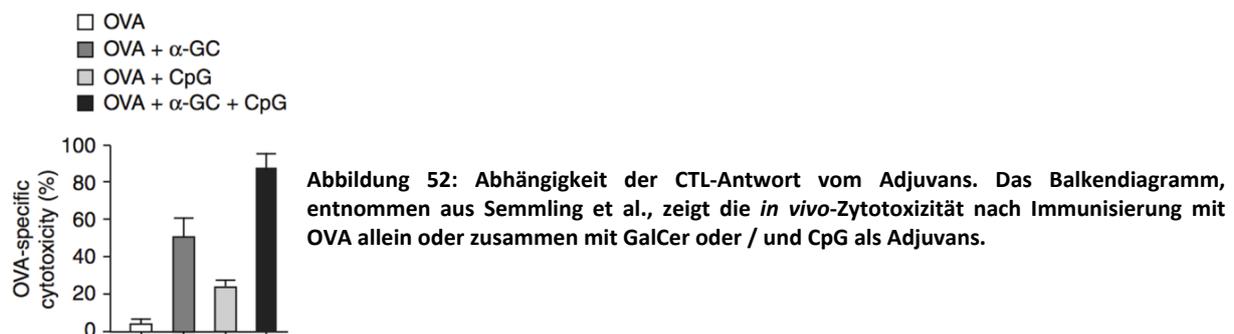
**Abbildung 51: Abhängigkeit der CTL-Antwort von CCL17. Der Auszug aus Semmling et al. 2010 zeigt die dort veröffentlichte Abhängigkeit zellvermittelter Zytotoxizitäts-Reaktionen in Abhängigkeit von CCL17 und seinem Rezeptor CCR4.**

Allerdings sind mehrere Abweichungen zwischen dem eigenen und dem Protokoll aus genannter Publikation vorhanden hinsichtlich der Durchführung des Primings:

Nach Angaben der Autoren wurde dieser Schritt durch die intravenöse Gabe einer Mischung von OVA und GalCer ohne CpG erreicht, GalCer also als Adjuvans eingesetzt. In dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll erfolgte die Administration von OVA, gegebenenfalls unter Verwendung des Adjuvans CpG, subkutan in die Schwanzwurzel. 24 h zuvor war einigen Versuchsgruppen intraperitoneal GalCer verabreicht worden.

Daraus ergeben sich folgende Feststellungen:

Bei subkutaner Verabreichung des Modell-Antigens erfolgt die Antigenpräsentation in den entsprechenden drainierenden LK. Präsentierende Zellen sind dabei in einer ersten Welle residente LK-DC, die dort über die Lymphe angespültes Antigen aufnehmen, später jedoch auch eintreffende migratorische DC der Peripherie (Itano et al., 2003; Sixt et al., 2005). Bei systemischer Verabreichung durch intraperitoneale oder -venöse Gabe wird dagegen verstärkt die Milz in ihrer Aufgabe als Blutfilter angesprochen. Das wird darin deutlich, dass es bei Semmling et al. mit dem dort gewählten Dosierungsregime in splenektomierten Tieren zu keinerlei Zytotoxizität kommt.



In einem weiteren Teilerperiment, aus welchem die Gruppe von Christian Kurts einen Synergismus von „normaler“ und alternativer Lizenzgebung ableitete, wird der systemische Einsatz von GalCer mit CpG kombiniert. Dagegen konnte, möglicherweise durch die zeitliche Trennung von OVA und GalCer, ohne den Zusatz von CpG in dieser Arbeit keine ausreichende adjuvante Wirkung von GalCer allein festgestellt werden; so behandelte Tiere zeigten nahezu keine Lyse der Zielzellen ähnlich den ausschließlich mit OVA behandelten Versuchsgruppen. Andererseits konnte durch die Vorbehandlung mit GalCer die Zytotoxizität noch gegenüber einer ausschließlichen OVA/CpG-Behandlung gesteigert werden. Dieser Effekt war jedoch in IFN $\gamma$ -defizienten Tieren aufgehoben. Somit könnte in dem vorliegenden Protokoll der GalCer-Effekt auch auf eine durch die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung medierte erhöhte Transkription von MHC-I-Molekülen und Fas-Rezeptor (CD95) in den Zielzellen zurückgehen.

Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der verschiedenen Protokolle liegt wahrscheinlich darin, dass bei dem für diese Arbeit gewählten Protokoll die zeitliche Trennung der GalCer- von der OVA/CpG-Gabe und der gewählten subkutanen Immunisierungsrouten eher der konventionelle Weg der Lizenzgebung eingeschlagen wird, während die gleichzeitige, systemische Verabreichung von OVA und GalCer in einer alternativen Lizenzierung der antigenpräsentierenden DC durch NKT-Zellen resultiert (Bousoo and Albert, 2010). Die konventionelle,  $T_H$ -vermittelte Lizenzgebung hat eine Sekretion von CCL3 und CCL4 und somit eine Attraktion CCR5-exprimierender  $CD8^+$  T-Zellen zur Folge. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestätigen, dass CCL17 in diesen Mechanismus nicht involviert ist.

#### **4.3.3. Die Rolle von CCL17 in der humoralen Immunantwort**

Erhöhte CCL17-Spiegel konnten im Menschen bereits unter verschiedenen pathologischen Bedingungen nachgewiesen werden; hierzu zählen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Multiple Sklerose und atopische Dermatitis (AD) (Narikawa et al., 2004; Jahnz-Rozyk et al., 2005; Song et al., 2006; Perros et al., 2009; Morita et al., 2010; Vijayanand et al., 2010; Hayashida et al., 2011). Dabei konnten einige Studien eine direkte Korrelation von Krankheitsgrad und CCL17-Plasmaspiegeln belegen (Kakinuma et al., 2001).

In Vorarbeiten unserer Gruppe konnte anhand CCL17-defizienter Mäuse in einem Modell für atopische Dermatitis (AD) ein Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen Schweregrad und CCL17-Spiegeln gefunden werden (Stutte et al., 2010):

Unterbleibt die Produktion des Chemokins, verbessern sich sowohl die lokale Entzündung der Haut als auch verschiedene Immunglobulinspiegel. Die Level für antigenspezifisches IgE, IgG2a und IgG1 liegen signifikant unter dem Niveau von CCL17-profizienten Mäusen; im Fall von IgE zeigt sich sogar der Gesamt-IgE-Serumspiegel signifikant erniedrigt (vgl. Dissertation Susanne Stutte). Dieses konnte auf eine verminderte Migration der DC der Haut in die drainierenden Lymphknoten zurückgeführt werden. Mechanistisch scheint CCL17 die DC für die Reaktion auf Liganden für CCR7 und CXCR4, nämlich CCL19, CCL21 sowie CXCL12, die eine Schlüsselfunktion in diesem Prozess einnehmen, zu sensibilisieren und die Signalweiterleitung in das Zellinnere zu ermöglichen.

Nicht auszuschließen ist jedoch auch, dass CCL17 noch bei anderen Vorgängen mechanistisch involviert ist; eine Beteiligung an Reaktionen der humoralen Immunität war bislang noch nicht untersucht worden.

T-Helferzellen, vor allem  $T_H2$ , exprimieren CCR4, den Rezeptor für CCL17, auf ihrer Oberfläche (D'Ambrosio et al., 1998; Imai et al., 1999). Aber auch weitere Ansatzpunkte für eine Beteiligung für

CCL17 waren denkbar. Humane B-Zellen sind einerseits zur CCL17-Sekretion befähigt (Lin et al., 2003; Nakayama et al., 2004), weiterhin exprimieren sie auch CCR4, vor allem IgG<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Lymphozyten, und zeigen einer Publikation nach, wenn auch nur geringfügig, Migration auf CCL17-Induktion hin (Johansson et al., 2005).

Dementsprechend wurden CCL17<sup>E/E</sup>-Mäuse zunächst auf basale, dann auf T-Helfer-abhängige, und schließlich T-Helfer-unabhängige Immunglobulinproduktion nach erfolgter Immunisierung untersucht. Anfänglich auftretende Unterschiede in den antigenspezifischen Ig-Spiegeln wurden durch die Verwendung von Wurfgeschwisterkontrollen relativiert. Somit scheint CCL17 mechanistisch keine essentielle Rolle zu besitzen und auch nicht das Migrationsverhalten der B-Zellen oder an ihrer Aktivierung beteiligte T-Zellen essentiell zu beeinflussen.

Eine durch GalCer-Injektion artifiziell hervorgerufene Expression von CCL17 in der Milz führte ebenfalls in keinem der durchgeführten Experimente zu signifikanten Unterschieden in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CCL17.

Damit bestätigt sich, dass die beobachtete Absenkung verschiedener Immunglobulinspiegel im AD-Modell bei CCL17-defizienten Mäusen wahrscheinlich ausschließlich auf die Beteiligung von CCL17 an der Migration antigenpräsentierender DC zurückgeht, und somit kein anderer Mechanismus beteiligt ist.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsexperimenten wurden mit der intravenösen oder intraperitonealen Gabe jeweils Applikationsformen gewählt, bei denen zumindest eine Teilmenge des Antigens systemisch verfügbar wurde und die sekundären lymphatischen Organe passiv erreichte. Im AD-Modell dagegen wurde die Applikation des Antigens kutan durchgeführt, so dass DC bzw. LC und deren Migration zu hautdrainierenden LK bei der Einleitung von humoralen Immunantworten unerlässlich waren.

#### **4.4. Ausblick**

Unter Verwendung des synthetisch hergestellten NKT-Zell-Stimulans GalCer ist es möglich, die milzspezifische Herunterregulation des Chemokins CCL17 zu umgehen und eine erhöhte Frequenz CCL17-produzierender Zellen sowie eine verstärkte Sekretion des Proteins zu induzieren. Dieses Vorgehen ermöglichte in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zur Regulation von CCL17.

Es bleibt jedoch zu untersuchen, ob und wann eine auf NKT-Zell-Stimulation folgende CCL17-Induktion in der Milz auch tatsächlich *in vivo* erfolgt. Eine naheliegende Möglichkeit bietet eine Infektion mit Bakterien, die NKT-Zell-aktivierende Glykolipide freisetzen. Dies ist z.B. der Fall bei

Borrelia-Spezies, den Erregern der Lyme-Borreliose. Bei dieser Infektion verhindert ein Shift zu T<sub>H</sub>2-Immunreaktionen nach einer initialen T<sub>H</sub>1-Antwort eine Chronifizierung der Krankheit (Kang et al., 1997; Widhe et al., 2004). Daraus könnten hypothetisch eine erhöhte CCL17-Sekretion, damit eine verbesserte Kreuzpräsentation und somit eine effizientere Pathogen-Eliminierung resultieren.

Denkbar wäre auch ein zusätzlicher, NKT-Zell-unabhängiger Induktionsmechanismus für CCL17 in der Milz. Ruft man sich die Resultate der erfolgten Genexpressionsanalyse vor Augen, bei welcher eine Anreicherung T<sub>H</sub>1-assoziiierter Chemokine wie CXCL10, CCL4, CXCL9 und CCL3 in der Milz auftrat, stellt sich die Frage, ob möglicherweise eher T<sub>H</sub>2-assoziierte Krankheiten eine lokale CCL17-Induktion hervorrufen. Eine Ursache könnte z.B. die Abwehr parasitärer Infektionen sein.

Bislang liegen Daten aus einem murinen Filarien-Infektionsmodell vor, in dem eine Rolle von CCL17 in der Kontrolle der Infektion aufgedeckt wurde. CCL17-defiziente Tiere zeigten hier eine schlechtere Kontrolle der Infektion, was sich in einer vergrößerten Wurmlast sowie einer erhöhten Zahl an Mastzellen in der Haut manifestierte. In diesem Modell kommt es jedoch zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten Frequenz CCL17-positiver DC in der Milz (Specht et al., 2011). Ebenso wenig konnte eine Hochregulation des Chemokins in einem Schistosomiasis-Modell beobachtet werden (L. Layland, unveröffentlicht). Bei dieser Infektion kommt es vor allem im späteren Verlauf zu einem starken Anstieg von T<sub>H</sub>2-Antworten (van der Werf et al., 2011).

Auch an der Immunabwehr des obligat intrazellulär lebenden Parasiten *Leishmania donovani* ist IL-4 beteiligt; IL-4<sup>-/-</sup> sowie IL-4Ra<sup>-/-</sup>-defiziente Mäusen zeigten eine signifikant erhöhte Parasitenlast in Milz und Leber (Stäger et al., 2003a). Zudem wurde IL-4 ebenfalls in einen Kontext gebracht mit der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem murinen Leishmaniose-Modell (Stäger et al., 2003b).

Infektionen mit einer Leishmania- oder den anfangs erwähnten Borrelia-Spezies bieten daher ebenfalls einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des Milzmilieus und der dortigen Suppression von CCL17.

## 5. Zusammenfassung

CCL17 spielt als induzierbares Chemokin bei einer Vielzahl von Immunreaktionen eine wichtige Rolle. Es vermittelt seine Wirkung über den Rezeptor CCR4 und wirkt somit auf aktivierte sowie Gedächtnis-T-Zellen (vorrangig T<sub>H</sub>2), regulatorische T-Zellen, Makrophagen und andere Zellen. In der Maus wird CCL17 normalerweise von einer Subpopulation CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC produziert und ist in zahlreichen Organen wie z.B. in Lunge, Haut, Lymphknoten und Peyer'schen Plaques exprimiert. Daher ist es umso interessanter, dass, obwohl in der Milz ebenfalls DC der in Frage kommenden Population angesiedelt sind, dort keinerlei CCL17-Expression beobachtet werden kann. Selbst nach Stimulation mittels TLR-Liganden oder Listerien-Infektion konnte CCL17 in der Milz kaum hochreguliert werden. Dagegen reagieren isolierte Milz-DC auf verschiedene Zytokine wie IL-4, GM-CSF oder TNF $\alpha$  mit einer verstärkten CCL17-Produktion.

Eine vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen isolierten CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CCL17-negativen Milz- und CCL17-positiven LK-DC zeigte, dass eine große Zahl Interferon- $\gamma$ - (IFN- $\gamma$ ) induzierter Gene in der LK-DC-Population verhältnismäßig unterrepräsentiert vorliegen. Für IFN- $\gamma$  konnte in Literaturdaten ein supprimierender Effekt auf die CCL17-Produktion gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob IFN- $\gamma$  in der Milz ebenfalls verantwortlich für die CCL17-Suppression ist, wurde eine CCL17/EGFP-Mauslinie mit zusätzlicher Defizienz für den IFN- $\gamma$ -Rezeptor gezüchtet. Es konnte gezeigt werden, dass in dieser Linie nach TLR-Stimulation ein erhöhter Anteil der Milz-DC CCL17 produzieren.

Die Behandlung von Mäusen mit dem NKT-Zell-Stimulans GalCer kann *in vivo* CCL17 hochregulieren; besonders drastisch ist der Effekt bei zusätzlicher IFN $\gamma$ R-Defizienz. Dieser Stimulation liegt mechanistisch eine systemische Induktion der Zytokine IL-4 und GM-CSF zugrunde. Die gleichzeitige Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-4 sowie GM-CSF mit GalCer konnte der CCL17-Produktion entgegenwirken, der Einsatz von GM-CSF-defizienten Tieren sie komplett verhindern.

Somit konnte für die Milz ein organspezifischer Mechanismus der CCL17-Suppression beschrieben werden, der im Normalzustand spezifisch durch IFN- $\gamma$  mediiert wird, jedoch unter Umständen durch Hochregulation der Zytokine IL-4 und GM-CSF umgangen werden kann.

Um Gründe für diesen Mechanismus zu finden, wurde ausserdem die Rolle von CCL17 in der Milz bei der Einleitung humoraler T-Zell-abhängiger sowie -unabhängiger Immunreaktionen untersucht. Dabei konnte aufgedeckt werden, dass CCL17 hier höchstwahrscheinlich keine Rolle spielt, da Antikörperproduktion sowie Klassenwechsel durch Abwesenheit oder Überexpression von CCL17 unbeeinflusst blieben. Ebenfalls analysiert wurde der Einfluss von CCL17 sowie CCL17-produzierender DC auf die Überlebensrate im Sepsismodell. Auch hier war CCL17 an der Pathogenese nicht ursächlich beteiligt.

## 6. Summary

The inducible chemokine CCL17 plays an important role in many reactions of the immune system. CCL17 binds to the receptor CCR4 and attracts mostly activated and memory T cells with a Th2 preference, as well as regulatory T cells, macrophages and others. In mice, it is normally produced by a subset of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC and is expressed in organs like lung, skin, lymph nodes (LN) and Peyer's Patches. Therefore, it is striking that although DC of the respective population reside in the spleen, here no CCL17 expression can be detected. Even microbial challenges with TLR ligands or *Listeria* were shown to hardly enhance splenic CCL17 production. In contrast, isolated splenic DC are capable of an increased CCL17 production upon stimulation with cytokines like IL-4, GM-CSF or TNF $\alpha$ .

A comparative gene expression analysis between isolated splenic CCL17-negative and peripheral CCL17-positive CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DC uncovered that a large number of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-inducible genes are underrepresented in the LN DC population compared with splenic DC. IFN- $\gamma$  has been shown to suppress transcription from the CCL17 promoter. To test whether IFN- $\gamma$  is responsible for suppression of CCL17 production in the spleen, we crossed CCL17/EGFP mice with mice deficient for the IFN- $\gamma$  receptor. It could be shown that in the absence of IFN $\gamma$ R, an increased frequency of CCL17-producing DC was detectable in the spleen upon TLR stimulation.

Treatment of mice with the NKT cell stimulus GalCer leads to a moderate upregulation of CCL17 expression in the spleen, that was even more drastic in mice lacking IFN $\gamma$ R. The molecular mechanism behind this stimulation could be identified as a systemic induction of the cytokines IL-4 and GM-CSF. The simultaneous injection of neutralizing antibodies against these cytokines together with GalCer could counteract the splenic CCL17 production; in GM-CSF-deficient animals, it was completely abrogated.

These findings indicate that under normal circumstances, IFN- $\gamma$  suppresses CCL17 expression in the spleen specifically, but this effect can be overcome by upregulation of the cytokines IL-4 and GM-CSF.

To identify the reason for this organ-specific CCL17 suppression, humoral immune responses to T-helper-dependent and T-helper independent antigens, for which the spleen is known to be of pivotal importance, were analyzed. It could be shown that splenic CCL17 expression most likely does not play a role in both scenarios, as the magnitude of antibody production and class switch recombination was unaltered in mice without CCL17 or overexpressing it upon GalCer treatment. Furthermore, the importance of CCL17 and CCL17-producing DC in a murine model of sepsis was investigated. Also in this case, the chemokine CCL17 was not essentially involved in the pathogenesis.

## 7. Literaturverzeichnis

Abi-Younes, S., Si-Tahar, M., and Luster, A.D. (2001). The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4. *Thromb. Res.* *101*, 279–289.

Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H.E., and Seiler, P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J. Immunol.* *171*, 1148–1155.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* ... *404*, 193–197.

Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* *85*, 85–95.

Alferink, J., Lieberam, I., Reindl, W., Behrens, A., Weiss, S., Huser, N., Gerauer, K., Ross, R., Reske-Kunz, A.B., Ahmad-Nejad, P., Wagner, H., and Förster, I. (2003). Compartmentalized Production of CCL17 In Vivo: Strong Inducibility in Peripheral Dendritic Cells Contrasts Selective Absence from the Spleen. *Journal of Experimental Medicine* *197*, 585–599.

Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 787–820.

Alon, R., and Shulman, Z. (2011). Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. *Exp. Cell Res.* *317*, 632–641.

Altamura, M., Caradonna, L., Amati, L., Pellegrino, N.M., Urgesi, G., and Miniello, S. (2001). Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacol Immunotoxicol* *23*, 153–161.

Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 32–41.

Andrian, von, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 867–878.

Ansel, K.M., Harris, R.B.S., and Cyster, J.G. (2002). CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* *16*, 67–76.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* *25*, 25–29.

Baig, S., Palmer, L.E., Owen, M.J., Williams, J., Kehoe, P.G., and Love, S. (2012). Clusterin mRNA and Protein in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.*

Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* *17*, 341–352.

- Bandeira-Melo, C., Sugiyama, K., Woods, L.J., and Weller, P.F. (2001). Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J. Immunol.* *166*, 4813–4817.
- Bates, E.E., Fournier, N., Garcia, E., Valladeau, J., Durand, I., Pin, J.J., Zurawski, S.M., Patel, S., Abrams, J.S., Lebecque, S., et al. (1999). APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J. Immunol.* *163*, 1973–1983.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 488–495.
- Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., and Heath, W.R. (2005). CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J. Immunol.* *175*, 196–200.
- Berger, T.G., Schulze-Koops, H., Schäfer, M., Müller, E., and Lutz, M.B. (2009). Immature and maturation-resistant human dendritic cells generated from bone marrow require two stimulations to induce T cell anergy in vitro. *PLoS ONE* *4*, e6645.
- Bernardini, G., Hedrick, J., Sozzani, S., Luini, W., Spinetti, G., Weiss, M., Menon, S., Zlotnik, A., Mantovani, A., Santoni, A., et al. (1998). Identification of the CC chemokines TARC and macrophage inflammatory protein-1 beta as novel functional ligands for the CCR8 receptor. *Eur. J. Immunol.* *28*, 582–588.
- Berndt, B.E., Zhang, M., Chen, G.-H., Huffnagle, G.B., and Kao, J.Y. (2007). The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. *J. Immunol.* *179*, 6255–6262.
- Beytout, J., Tournilhac, O., and Laurichesse, H. (2003). [Asplenia and hyposplenism]. *Presse Med* *32*, S5–9.
- Biburger, M., and Tiegs, G. (2005). Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J. Immunol.* *175*, 1540–1550.
- Boldin, M.P., Taganov, K.D., Rao, D.S., Yang, L., Zhao, J.L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., et al. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *Journal of Experimental Medicine*.
- Bousso, P., and Albert, M.L. (2010). Signal 0 for guided priming of CTLs: NKT cells do it too. *Nat. Immunol.* *11*, 284–286.
- Brasel, K., Escobar, S., Anderberg, R., de Vries, P., Gruss, H.J., and Lyman, S.D. (1995). Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia* *9*, 1212–1218.
- Buiting, A.M., De Rover, Z., Kraal, G., and Van Rooijen, N. (1996). Humoral immune responses against particulate bacterial antigens are dependent on marginal metallophilic macrophages in the spleen. *Scand. J. Immunol.* *43*, 398–405.
- Buras, J.A., Holzmann, B., and Sitkovsky, M. (2005). Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* *4*, 854–865.

- Burdin, N., Brossay, L., and Kronenberg, M. (1999). Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur. J. Immunol.* *29*, 2014–2025.
- Caminschi, I., Ahmet, F., Heger, K., Brady, J., Nutt, S.L., Vremec, D., Pietersz, S., Lahoud, M.H., Schofield, L., Hansen, D.S., et al. (2007). Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* *204*, 2579–2590.
- Car, B.D., Eng, V.M., Schnyder, B., Ozmen, L., Huang, S., Gallay, P., Heumann, D., Aguet, M., and Ryffel, B. (1994). Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med* *179*, 1437–1444.
- Caton, M.L., Smith-Raska, M.R., and Reizis, B. (2007). Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* *204*, 1653–1664.
- Chaput, N., Taieb, J., and Zitvogel, L. (2006). [Innate defence against tumor cells: the killer cell IKDC]. *Bull Cancer* *93*, 449–451.
- Chong, M.M.W., Metcalf, D., Jamieson, E., Alexander, W.S., and Kay, T.W.H. (2005). Suppressor of cytokine signaling-1 in T cells and macrophages is critical for preventing lethal inflammation. *Blood* *106*, 1668–1675.
- Chvatchko, Y., Hoogewerf, A.J., Meyer, A., Alouani, S., Juillard, P., Buser, R., Conquet, F., Proudfoot, A.E., Wells, T.N., and Power, C.A. (2000). A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* *191*, 1755–1764.
- Clemetson, K.J., Clemetson, J.M., Proudfoot, A.E., Power, C.A., Baggiolini, M., and Wells, T.N. (2000). Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* *96*, 4046–4054.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* *204*, 1757–1764.
- Coquet, J.M., Chakravarti, S., Kyparissoudis, K., McNab, F.W., Pitt, L.A., McKenzie, B.S., Berzins, S.P., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2008). Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 11287–11292.
- Coquet, J.M., Kyparissoudis, K., Pellicci, D.G., Besra, G., Berzins, S.P., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2007). IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* *178*, 2827–2834.
- Crawford, J.H., Yang, S., Zhou, M., Simms, H.H., and Wang, P. (2004). Down-regulation of hepatic CYP1A2 plays an important role in inflammatory responses in sepsis. *Crit. Care Med.* *32*, 502–508.
- D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J. Immunol.* *161*, 5111–5115.

- Daemen, T., Riezebos-Brilman, A., Regts, J., Dontje, B., van der Zee, A., and Wilschut, J. (2004). Superior therapeutic efficacy of alphavirus-mediated immunization against human papilloma virus type 16 antigens in a murine tumour model: effects of the route of immunization. *Antivir. Ther. (Lond.)* *9*, 733–742.
- Darrasse-Jèze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.-H., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* *206*, 1853–1862.
- de Baey, A., and Lanzavecchia, A. (2000). The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J Exp Med* *191*, 743–748.
- De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N.H., Streeter, P.R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S.C., Carlson, R., Shornick, L.P., and Strauss-Schoenberger, J. (1994). Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* *264*, 703–707.
- Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.-W., Karin, M., Ware, C.F., and Green, D.R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* *17*, 525–535.
- del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., and Förster, R. (2007). CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* *178*, 6861–6866.
- Dewan, U., Kumari, N., Jaiswal, A., Behari, S., and Jain, M. (2010). Extramedullary hemopoiesis with undiagnosed, early myelofibrosis causing spastic compressive myelopathy: Case report and review. *Indian J Orthop* *44*, 98–103.
- Dickensheets, H.L., Venkataraman, C., Schindler, U., and Donnelly, R.P. (1999). Interferons inhibit activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *96*, 10800–10805.
- Echtenacher, B., Falk, W., Männel, D.N., and Krammer, P.H. (1990). Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* *145*, 3762–3766.
- Edelson, B.T., KC, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* *207*, 823–836.
- Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M.C., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* *33*, 827–833.
- Ejstrud, P., Kristensen, B., Hansen, J.B., Madsen, K.M., Schønheyder, H.C., and Sørensen, H.T. (2000). Risk and patterns of bacteraemia after splenectomy: a population-based study. *Scand. J. Infect. Dis.* *32*, 521–525.

- Esser, C., Rannug, A., and Stockinger, B. (2009). The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends in Immunology* *30*, 447–454.
- Faffe, D.S., Whitehead, T., Moore, P.E., Baraldo, S., Flynt, L., Bourgeois, K., Panettieri, R.A., and Shore, S.A. (2003). IL-13 and IL-4 promote TARC release in human airway smooth muscle cells: role of IL-4 receptor genotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *285*, L907–14.
- Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 571–611.
- Flohé, S.B., Agrawal, H., Schmitz, D., Gertz, M., Flohé, S., and Schade, F.U. (2006). Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 473–481.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* *311*, 83–87.
- Forster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* *87*, 1037–1047.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23–33.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Fujii, S.-I., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., and Steinman, R.M. (2003). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J. Exp Med* *198*, 267–279.
- Fujii-Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Shinazawa, M., Yu, B., Koga, T., Furue, M., and Yanagihara, Y. (2004). Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J. Invest. Dermatol.* *122*, 20–28.
- Fujisawa, T., Fujisawa, R., Kato, Y., Nakayama, T., Morita, A., Katsumata, H., Nishimori, H., Iguchi, K., Kamiya, H., Gray, P.W., et al. (2002). Presence of high contents of thymus and activation-regulated chemokine in platelets and elevated plasma levels of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *110*, 139–146.
- Fujita, H., Asahina, A., Sugaya, M., Nakamura, K., Gao, P., Fujiwara, H., and Tamaki, K. (2005). Differential production of Th1- and Th2-type chemokines by mouse Langerhans cells and splenic dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 343–350.

- Fütterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* *9*, 59–70.
- Fyfe, L., Maingay, J., Robinson, A.C., and Howie, S.E. (1991). Murine immune response to HIV-1 p24 core protein following subcutaneous, intraperitoneal and intravenous immunization. *Immunology* *74*, 467–472.
- Garlisi, C.G., Xiao, H., Tian, F., Hedrick, J.A., Billah, M.M., Egan, R.W., and Umland, S.P. (1999). The assignment of chemokine-chemokine receptor pairs: TARC and MIP-1 beta are not ligands for human CC-chemokine receptor 8. *Eur. J. Immunol.* *29*, 3210–3215.
- Gatto, L., Berlatto, C., Poli, V., Tininini, S., Kinjyo, I., Yoshimura, A., Cassatella, M.A., and Bazzoni, F. (2004). Analysis of SOCS-3 promoter responses to interferon gamma. *J. Biol. Chem.* *279*, 13746–13754.
- Gear, A.R.L., and Camerini, D. (2003). Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation* *10*, 335–350.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656–661.
- Golde, W.T., Gollobin, P., and Rodriguez, L.L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* *34*, 39–43.
- Goto, M., Murakawa, M., Kadoshima-Yamaoka, K., Tanaka, Y., Nagahira, K., Fukuda, Y., and Nishimura, T. (2009). Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22. *Cell. Immunol.* *254*, 81–84.
- Guabiraba, R., Marques, R.E., Besnard, A.-G., Fagundes, C.T., Souza, D.G., Ryffel, B., and Teixeira, M.M. (2010). Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLoS ONE* *5*, e15680.
- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2089–2094.
- Guimont-Desrochers, F., Cappello, Z.J., Chagnon, M., McDuffie, M., and Lesage, S. (2009). Cutting edge: genetic characterization of IFN-producing killer dendritic cells. *The Journal of Immunology* *182*, 5193–5197.
- Haan, den, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* *192*, 1685–1696.
- Hansen, K., and Singer, D.B. (2001). Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited. *Pediatr. Dev. Pathol.* *4*, 105–121.
- Hashimoto, M., Hiwatashi, K., Ichiyama, K., Morita, R., Sekiya, T., Kimura, A., Sugiyama, Y., Sibata, T., Kuroda, K., Takahashi, R., et al. (2011). SOCS1 regulates type I/type II NKT cell balance by regulating IFNgamma signaling. *Int. Immunol.* *23*, 165–176.

- Hashimoto, S., Nakamura, K., Oyama, N., Kaneko, F., Tsunemi, Y., Saeki, H., and Tamaki, K. (2006). Macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 produced by monocyte derived dendritic cells reflects the disease activity in patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* *44*, 93–99.
- Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G., and Smyth, M.J. (2003). Alpha-galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 9464–9469.
- Hayashida, S., Uchi, H., Takeuchi, S., Esaki, H., Moroi, Y., and Furue, M. (2011). Significant correlation of serum IL-22 levels with CCL17 levels in atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* *61*, 78–79.
- He, Z., Kokkinaki, M., Pant, D., Gallicano, G.I., and Dym, M. (2009). Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction* *137*, 901–911.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 126–134.
- Hebenstreit, D., Luft, P., Schmiedlechner, A., Duschl, A., and Horejs-Hoeck, J. (2005). SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene expression in HEK293 cells. *Mol. Immunol.* *42*, 295–303.
- Heinemann, A., Hartnell, A., Stubbs, V.E., Murakami, K., Soler, D., LaRosa, G., Askenase, P.W., Williams, T.J., and Sabroe, I. (2000). Basophil responses to chemokines are regulated by both sequential and cooperative receptor signaling. *J. Immunol.* *165*, 7224–7233.
- Heiseke, A.F., Faul, A.C., Lehr, H.-A., Förster, I., Schmid, R.M., Krug, A.B., and Reindl, W. (2011). CCL17 Promotes Intestinal Inflammation in Mice and Counteracts Regulatory T Cell-Mediated Protection From Colitis. *Gastroenterology*.
- Heit, A., Huster, K.M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D.H., and Wagner, H. (2004). CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J. Immunol.* *172*, 1501–1507.
- Hemmi, H., and Akira, S. (2005). TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy* *86*, 120–135.
- Hieshima, K., Ohtani, H., Shibano, M., Izawa, D., Nakayama, T., Kawasaki, Y., Shiba, F., Shiota, M., Katou, F., Saito, T., et al. (2003). CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J. Immunol.* *170*, 1452–1461.
- Hijnen, D., De Bruin-Weller, M., Oosting, B., Lebre, C., De Jong, E., Bruijnzeel-Koomen, C., and Knol, E. (2004). Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell- attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *113*, 334–340.
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* *322*, 1097–1100.

Hochweller, K., Miloud, T., Striegler, J., Naik, S., Hammerling, G.J., and Garbi, N. (2009). Homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs is controlled by regulation of their precursors via a feedback loop. *Blood* *114*, 4411–4421.

Holmdahl, R., and Malissen, B. (2012). The need for littermate controls. *Eur. J. Immunol.* *42*, 45–47.

Hong, L., Webb, T.J., and Wilkes, D.S. (2007). Dendritic cell-T cell interactions: CD8 alpha alpha expressed on dendritic cells regulates T cell proliferation. *Immunol. Lett.* *108*, 174–178.

Hoogewerf, A., Black, D., Proudfoot, A.E., Wells, T.N., and Power, C.A. (1996). Molecular cloning of murine CC CKR-4 and high affinity binding of chemokines to murine and human CC CKR-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *218*, 337–343.

Hoover, D.M., Boulegue, C., Yang, D., Oppenheim, J.J., Tucker, K., Lu, W., and Lubkowski, J. (2002). The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J. Biol. Chem.* *277*, 37647–37654.

Horikawa, T., Nakayama, T., Hikita, I., Yamada, H., Fujisawa, R., Bito, T., Harada, S., Fukunaga, A., Chantry, D., Gray, P.W., et al. (2002). IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int. Immunol.* *14*, 767–773.

Hu, X., and Ivashkiv, L.B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* *31*, 539–550.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* *37*, 1–13.

Huang, Z., Xin, J., Coleman, J., and Huang, H. (2005). IFN-gamma suppresses STAT6 phosphorylation by inhibiting its recruitment to the IL-4 receptor. *J. Immunol.* *174*, 1332–1337.

Hundelshausen, von, P. (2007). Platelets as Immune Cells. *Circ. Res.*

Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J. Biol. Chem.* *283*, 16693–16701.

Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* *194*, 847–853.

Iikura, M., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Kawasaki, H., Matsushima, K., Kitaura, M., Morita, Y., Yoshie, O., Yamamoto, K., and Hirai, K. (2001). Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4. *J. Leukoc. Biol.* *70*, 113–120.

Iliev, I.D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2009). Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol* *2*, 340–350.

- Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1997). The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J. Biol. Chem.* *272*, 15036–15042.
- Imai, T., Chantry, D., Raport, C.J., Wood, C.L., Nishimura, M., Godiska, R., Yoshie, O., and Gray, P.W. (1998). Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J. Biol. Chem.* *273*, 1764–1768.
- Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P.W., Matsushima, K., and Yoshie, O. (1999). Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol.* *11*, 81–88.
- Inohara, N., and Núñez, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 371–382.
- Inoue, H., Iga, M., Xin, M., Asahi, S., Nakamura, T., Kurita, R., Nakayama, M., Nakazaki, Y., Takayama, K., Nakanishi, Y., et al. (2008). TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model. *Cancer Immunol. Immunother.* *57*, 1399–1411.
- Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y., and Jenkins, M.K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* *19*, 47–57.
- Ito, H., Koide, N., Hassan, F., Islam, S., Tumurkhuu, G., Mori, I., Yoshida, T., Kakumu, S., Moriwaki, H., and Yokochi, T. (2006). Lethal endotoxic shock using alpha-galactosylceramide sensitization as a new experimental model of septic shock. *Lab. Invest.* *86*, 254–261.
- Ivanov, I.I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host & Microbe* *4*, 337–349.
- Iwata, M. (2009). Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Seminars in Immunology* *21*, 8–13.
- Iwata, M., and Yokota, A. (2011). Retinoic acid production by intestinal dendritic cells. *Vitam. Horm.* *86*, 127–152.
- Jackson, A., Nanton, M.R., O'Donnell, H., Akue, A.D., and McSorley, S.J. (2010). Innate immune activation during Salmonella infection initiates extramedullary erythropoiesis and splenomegaly. *The Journal of Immunology* *185*, 6198–6204.
- Jahnz-Rozyk, K., Targowski, T., Paluchowska, E., Owczarek, W., and Kucharczyk, A. (2005). Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy* *60*, 685–688.
- Jenne, D.E., and Tschopp, J. (1992). Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem. Sci.* *17*, 154–159.

- Jensen, B.A., Leeman, R.J., Schlezinger, J.J., and Sherr, D.H. (2003). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists suppress interleukin-6 expression by bone marrow stromal cells: an immunotoxicology study. *Environ Health* 2, 16.
- Johansson, C., Ahlstedt, I., Furubacka, S., Johnsson, E., Agace, W.W., and Quiding-Järbrink, M. (2005). Differential expression of chemokine receptors on human IgA+ and IgG+ B cells. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 279–287.
- Jones, S.E., and Jomary, C. (2002). Clusterin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 427–431.
- Juremalm, M., Olsson, N., and Nilsson, G. (2002). Selective CCL5/RANTES-induced mast cell migration through interactions with chemokine receptors CCR1 and CCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 480–485.
- Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Mitsui, H., Tada, Y., Saeki, H., Torii, H., Asahina, A., Onai, N., Matsushima, K., et al. (2001). 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, 535–541.
- Kakinuma, T., Wakugawa, M., Nakamura, K., Hino, H., Matsushima, K., and Tamaki, K. (2003). High level of thymus and activation-regulated chemokine in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. *Br. J. Dermatol.* 148, 203–210.
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30.
- Kang, I., Barthold, S.W., Persing, D.H., and Bockenstedt, L.K. (1997). T-helper-cell cytokines in the early evolution of murine Lyme arthritis. *Infect. Immun.* 65, 3107–3111.
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., and Grusby, M.J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313–319.
- Kasperska-Zajac, A., Brzoza, Z., and Rogala, B. (2008). Platelet function in cutaneous diseases. *Platelets* 19, 317–321.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19–28.
- Katoh, N. (2009). Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. *J. Dermatol. Sci.* 53, 89–95.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., et al. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626–1629.
- Kim, C.H., Johnston, B., and Butcher, E.C. (2002). Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100, 11–16.

Kojo, S., Elly, C., Harada, Y., Langdon, W.Y., Kronenberg, M., and Liu, Y.-C. (2009). Mechanisms of NKT cell anergy induction involve Cbl-b-promoted monoubiquitination of CARMA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 17847–17851.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661–672.

Kondo, T., and Takiguchi, M. (2009). Human memory CCR4+CD8+ T cell subset has the ability to produce multiple cytokines. *Int. Immunol.* 21, 523–532.

Kumagai, N., Fukuda, K., and Nishida, T. (2000). Synergistic effect of TNF-alpha and IL-4 on the expression of thymus- and activation-regulated chemokine in human corneal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 1–5.

Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., and Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J. Immunol.* 166, 1439–1442.

Kushwah, R., Oliver, J.R., Zhang, J., Siminovitch, K.A., and Hu, J. (2009). Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 183, 7104–7118.

Kwon, Y.S., Oh, S.H., Wu, W.H., Bae, B.G., Lee, H.J., Lee, M.-G., and Lee, K.H. (2010). CC chemokines as potential immunologic markers correlated with clinical improvement of atopic dermatitis patients by immunotherapy. *Exp. Dermatol.* 19, 246–251.

Lagos, D., Pollara, G., Henderson, S., Gratrix, F., Fabani, M., Milne, R.S.B., Gotch, F., and Boshoff, C. (2010). miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat. Cell Biol.* 12, 513–519.

Le Bourhis, L., Magalhaes, J.G., Selvanantham, T., Travassos, L.H., Geddes, K., Fritz, J.H., Viala, J., Tedin, K., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2009). Role of Nod1 in mucosal dendritic cells during Salmonella pathogenicity island 1-independent Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 77, 4480–4486.

Lebre, M.C., Burwell, T., Vieira, P.L., Lora, J., Coyle, A.J., Kapsenberg, M.L., Clausen, B.E., and De Jong, E.C. (2005). Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol. Cell Biol.* 83, 525–535.

Leite-de-Moraes, M.C., Lisbonne, M., Arnould, A., Machavoine, F., Herbelin, A., Dy, M., and Schneider, E. (2002). Ligand-activated natural killer T lymphocytes promptly produce IL-3 and GM-CSF in vivo: relevance to peripheral myeloid recruitment. *Eur. J. Immunol.* 32, 1897–1904.

Liddiard, K., Welch, J.S., Lozach, J., Heinz, S., Glass, C.K., and Greaves, D.R. (2006). Interleukin-4 induction of the CC chemokine TARC(CCL 17) in murine macrophages is mediated by multiple STAT 6 sites in the TARC gene promoter. *BMC Mol Biol* 7, 45.

Lieberam, I., and Förster, I. (1999). The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 2684–2694.

- Lin, L., Nonoyama, S., Oshiba, A., Kabasawa, Y., and Mizutani, S. (2003). TARC and MDC are produced by CD40 activated human B cells and are elevated in the sera of infantile atopic dermatitis patients. *J. Med. Dent. Sci.* *50*, 27–33.
- Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Development and homeostasis of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2099–2102.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007a). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat. Immunol.* *8*, 578–583.
- Liu, Y., Goff, R.D., Zhou, D., Mattner, J., Sullivan, B.A., Khurana, A., Cantu, C., Ravkov, E.V., Ibegbu, C.C., Altman, J.D., et al. (2006). A modified alpha-galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells. *J. Immunol. Methods* *312*, 34–39.
- Liu, Y., Promeneur, D., Rojek, A., Kumar, N., Frøkiaer, J., Nielsen, S., King, L.S., Agre, P., and Carbrey, J.M. (2007b). Aquaporin 9 is the major pathway for glycerol uptake by mouse erythrocytes, with implications for malarial virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12560–12564.
- Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J.H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (2001). The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J. Biol. Chem.* *276*, 2986–2991.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996). Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *J. Immunol.* *156*, 322–327.
- Luber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keeffe, M., et al. (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* *32*, 279–289.
- Luther, S.A., and Cyster, J.G. (2001). Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* *2*, 102–107.
- Lyman, S.D., James, L., Johnson, L., Brasel, K., de Vries, P., Escobar, S.S., Downey, H., Splett, R.R., Beckmann, M.P., and McKenna, H.J. (1994). Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* *83*, 2795–2801.
- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* *97*, 3333–3341.
- Marine, J.C., McKay, C., Wang, D., Topham, D.J., Parganas, E., Nakajima, H., Pendeville, H., Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A., et al. (1999). SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* *98*, 617–627.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* *14*, 617–629.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 606–616.

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* ... 388, 394–397.
- Miyasaka, M., and Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 360–370.
- Mori, S., Nakano, H., Aritomi, K., Wang, C.R., Gunn, M.D., and Kakiuchi, T. (2001). Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses. *J Exp Med* 193, 207–218.
- Morita, E., Takahashi, H., Niihara, H., Dekio, I., Sumikawa, Y., Murakami, Y., and Matsunaka, H. (2010). Stratum corneum TARC level is a new indicator of lesional skin inflammation in atopic dermatitis. *Allergy* 65, 1166–1172.
- Morita, Y., Iseki, A., Okamura, S., Suzuki, S., Nakauchi, H., and Ema, H. (2011). Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp. Hematol.* 39, 351–359.e3.
- Naik, S.H., Proietto, A.I., Wilson, N.S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M.H., O'Keeffe, M., Shao, Q.-X., Chen, W.-F., et al. (2005). Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol.* 174, 6592–6597.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M.D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171–1178.
- Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Nakayama, M., Kawa, K., and Yoshie, O. (2004). Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 78, 1665–1674.
- Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., and Shinomiya, N. (2008). Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 19, 605–613.
- Narikawa, K., Misu, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Sato, S., and Itoyama, Y. (2004). CSF chemokine levels in relapsing neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 149, 182–186.
- Naruse, M., Ishihara, Y., Miyagawa-Tomita, S., Koyama, A., and Hagiwara, H. (2002). 3-Methylcholanthrene, which binds to the arylhydrocarbon receptor, inhibits proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro and ossification in vivo. *Endocrinology* 143, 3575–3581.
- Nasu, K., Sun, B., Nishida, M., Fukuda, J., Narahara, H., and Miyakawa, I. (2004). Cultured human endometrial epithelial cells produce thymus and activation-regulated chemokine with stimulation of interleukin-4 and interleukin-13. *Fertil. Steril.* 82 Suppl 3, 1014–1018.
- Ngo, V.N., Korner, H., Gunn, M.D., Schmidt, K.N., Riminton, D.S., Cooper, M.D., Browning, J.L., Sedgwick, J.D., and Cyster, J.G. (1999). Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 189, 403–412.

- Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., et al. (2000). The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* *12*, 987–994.
- Nomura, T., Terada, N., Kim, W.J., Nakano, K., Fukuda, Y., Wakita, A., Numata, T., and Konno, A. (2002). Interleukin-13 induces thymus and activation-regulated chemokine (CCL17) in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* *20*, 49–55.
- Okamoto, H., Koizumi, K., Yamanaka, H., Saito, T., and Kamatani, N. (2003). A role for TARC/CCL17, a CC chemokine, in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* *30*, 2369–2373.
- Oliver, A.M., Martin, F., and Kearney, J.F. (1999). IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol.* *162*, 7198–7207.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 10113–10118.
- Pajak, B., and Orzechowski, A. (2006). Clusterin: the missing link in the calcium-dependent resistance of cancer cells to apoptogenic stimuli. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* *60*, 45–51.
- Pellas, T.C., and Weiss, L. (1990). Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. *Am. J. Anat.* *187*, 347–354.
- Pernis, A., Witthuhn, B., Keegan, A.D., Nelms, K., Garfein, E., Ihle, J.N., Paul, W.E., Pierce, J.H., and Rothman, P. (1995). Interleukin 4 signals through two related pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 7971–7975.
- Perros, F., Hoogsteden, H.C., Coyle, A.J., Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2009). Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy* *64*, 995–1002.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8<sup>-</sup> dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J. Immunol.* *166*, 5327–5330.
- Poppensieker, K., Otte, D.-M., Schürmann, B., Limmer, A., Dresing, P., Drews, E., Schumak, B., Klotz, L., Raasch, J., Mildner, A., et al. (2012). CC chemokine receptor 4 is required for experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating GM-CSF and IL-23 production in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 3897–3902.
- Power, C.A., Meyer, A., Nemeth, K., Bacon, K.B., Hoogewerf, A.J., Proudfoot, A.E., and Wells, T.N. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J. Biol. Chem.* *270*, 19495–19500.
- Pratt, A.J., and MacRae, I.J. (2009). The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J. Biol. Chem.* *284*, 17897–17901.

- Prifti, E., Zucker, J.-D., Clement, K., and Henegar, C. (2008). FunNet: an integrative tool for exploring transcriptional interactions. *Bioinformatics* *24*, 2636–2638.
- Ramirez, M.C., and Sigal, L.J. (2002). Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J. Immunol.* *169*, 6733–6742.
- Rayamajhi, M., Humann, J., Penheiter, K., Andreasen, K., and Lenz, L.L. (2010). Induction of IFN- $\alpha$  enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- $\gamma$ . *Journal of Experimental Medicine* *207*, 327–337.
- Rennert, P.D., James, D., Mackay, F., Browning, J.L., and Hochman, P.S. (1998). Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity* *9*, 71–79.
- Riezu-Boj, J.-I., Larrea, E., Aldabe, R., Guembe, L., Casares, N., Galeano, E., Echeverria, I., Sarobe, P., Herrero, I., Sangro, B., et al. (2011). Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. *J. Hepatol.* *54*, 422–431.
- Rusca, N., and Monticelli, S. (2011). MiR-146a in Immunity and Disease. *Molecular Biology International*.
- Sabatte, J., Faigle, W., Ceballos, A., Morelle, W., Rodríguez, C.R., Lenicov, F.R., Thépaut, M., Fieschi, F., Malchiodi, E., Fernández, M., et al. (2011). Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. *The Journal of Immunology* *187*, 5299–5309.
- Schindler, C., and Darnell, J.E. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 621–651.
- Schliehe, C., Redaelli, C., Engelhardt, S., Fehlings, M., Mueller, M., van Rooijen, N., Thiry, M., Hildner, K., Weller, H., and Groettrup, M. (2011). CD8- dendritic cells and macrophages cross-present poly(D,L-lactate-co-glycolate) acid microsphere-encapsulated antigen in vivo. *The Journal of Immunology* *187*, 2112–2121.
- Schürpf, T., and Springer, T.A. (2011). Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *Embo J.* *30*, 4712–4727.
- Scumpia, P.O., McAuliffe, P.F., O'Malley, K.A., Ungaro, R., Uchida, T., Matsumoto, T., Remick, D.G., Clare-Salzler, M.J., Moldawer, L.L., and Efron, P.A. (2005). CD11c<sup>+</sup> dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* *175*, 3282–3286.
- Semmling, V., Lukacs-Kornek, V., Thaiss, C.A., Quast, T., Hochheiser, K., Panzer, U., Rossjohn, J., Perlmutter, P., Cao, J., Godfrey, D.I., et al. (2010). Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat. Immunol.* *11*, 313–320.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/ $\text{iNOS}$ -producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* *19*, 59–70.
- Shiraki, R., Inoue, N., Kawasaki, S., Takei, A., Kadotani, M., Ohnishi, Y., Ejiri, J., Kobayashi, S., Hirata, K.-I., Kawashima, S., et al. (2004). Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb. Res.* *113*, 379–385.

- Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B., and Sorokin, L. (2005). The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22, 19–29.
- Slettenaar, V.I.F., and Wilson, J.L. (2006). The chemokine network: a target in cancer biology? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 962–974.
- Snapper, C.M., McIntyre, T.M., Mandler, R., Pecanha, L.M., Finkelman, F.D., Lees, A., and Mond, J.J. (1992). Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* 175, 1367–1371.
- Song, T.W., Sohn, M.H., Kim, E.S., Kim, K.W., and Kim, K.-E. (2006). Increased serum thymus and activation-regulated chemokine and cutaneous T cell-attracting chemokine levels in children with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* 36, 346–351.
- Specht, S., Frank, J., and al, E. (2011). CCL17 Controls Mast Cells for the Defense against Filarial Larval Entry. *The Journal of ...*
- Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V., and Dunn, A.R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 91, 5592–5596.
- Starr, R., Metcalf, D., Elefanty, A.G., Brysha, M., Willson, T.A., Nicola, N.A., Hilton, D.J., and Alexander, W.S. (1998). Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 95, 14395–14399.
- Stäger, S., Alexander, J., Carter, K.C., Brombacher, F., and Kaye, P.M. (2003a). Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect. Immun.* 71, 4804–4807.
- Stäger, S., Alexander, J., Kirby, A.C., Botto, M., Rooijen, N.V., Smith, D.F., Brombacher, F., and Kaye, P.M. (2003b). Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat. Med.* 9, 1287–1292.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142–1162.
- Stevens, J.C., Banks, G.T., Festing, M.F.W., and Fisher, E.M.C. (2007). Quiet mutations in inbred strains of mice. *Trends Mol Med* 13, 512–519.
- Stober, D., and Schirmbeck, R. (2001). IL-12/IL-18-dependent IFN- $\gamma$  release by murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*.
- Stutte, S., Gerbitzki, N., Novak, N., and Förster, I. (2012). Expression and Function of CCL17 in Atopic Dermatitis. *Intechopen.com*
- Stutte, S., Quast, T., Gerbitzki, N., Savinko, T., Novak, N., Reifenberger, J., Homey, B., Kolanus, W., Alenius, H., and Förster, I. (2010). Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 8736–8741.

- Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775–1785.
- Swartz, M.A., and Lund, A.W. (2012). Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nat. Rev. Cancer* 12, 210–219.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.
- Syed, F., Huang, C.C., Li, K., Liu, V., Shang, T., Amegadzie, B.Y., Griswold, D.E., Song, X.-Y.R., and Li, L. (2007). Identification of interleukin-13 related biomarkers using peripheral blood mononuclear cells. *Biomarkers* 12, 414–423.
- Taganov, K., and al, E. (2006). NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the ....*
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature ...* 380, 627–630.
- Taub, D.D., Ortaldo, J.R., Turcovski-Corrales, S.M., Key, M.L., Longo, D.L., and Murphy, W.J. (1996a). Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J. Leukoc. Biol.* 59, 81–89.
- Taub, D.D., Turcovski-Corrales, S.M., Key, M.L., Longo, D.L., and Murphy, W.J. (1996b). Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J. Immunol.* 156, 2095–2103.
- Terada, N., Nomura, T., Kim, W.J., Otsuka, Y., Takahashi, R., Kishi, H., Yamashita, T., Sugawara, N., Fukuda, S., Ikeda-Ito, T., et al. (2001). Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines. *Clin. Exp. Allergy* 31, 1923–1931.
- Terme, M., Mignot, G., Ullrich, E., Bonmort, M., Minard-Colin, V., Jacquet, A., Schultze, J.L., Kroemer, G., Leclerc, C., Chaput, N., et al. (2009). The dendritic cell-like functions of IFN-producing killer dendritic cells reside in the CD11b+ subset and are licensed by tumor cells. *Cancer Res.* 69, 6590–6597.
- Tili, E., Michaille, J.-J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C.G., Calin, G.A., et al. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* 179, 5082–5089.
- Traeger, T., Kessler, W., Assfalg, V., Cziupka, K., Koerner, P., Dassow, C., Breitbach, K., Mikulcak, M., Steinmetz, I., Pfeffer, K., et al. (2008). Detrimental role of CC chemokine receptor 4 in murine polymicrobial sepsis. *Infect. Immun.* 76, 5285–5293.
- Tschopp, J., and French, L.E. (1994). Clusterin: modulation of complement function. *Clin. Exp. Immunol.* 97 Suppl 2, 11–14.

- Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Nagakubo, D., Nakayama, T., Yoshie, O., Kagami, S., Shimazu, K., Kadono, T., Sugaya, M., et al. (2006). CCL17 transgenic mice show an enhanced Th2-type response to both allergic and non-allergic stimuli. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2116–2127.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., et al. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* *219*, 118–142.
- Ugucioni, M., Mackay, C.R., Ochensberger, B., Loetscher, P., Rhis, S., LaRosa, G.J., Rao, P., Ponath, P.D., Baggiolini, M., and Dahinden, C.A. (1997). High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J. Clin. Invest.* *100*, 1137–1143.
- Usui, K., Honda, S.-I., Yoshizawa, Y., Nakahashi-Oda, C., Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2012). Isolation and characterization of naïve follicular dendritic cells. *Mol. Immunol.* *50*, 172–176.
- van den Berg, A., Visser, L., and Poppema, S. (1999). High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Pathol.* *154*, 1685–1691.
- van der Werf, N., Redpath, S.A., Phythian-Adams, A.T., Azuma, M., Allen, J.E., Maizels, R.M., Macdonald, A.S., and Taylor, M.D. (2011). Th2 responses to helminth parasites can be therapeutically enhanced by, but are not dependent upon, GITR-GITR ligand costimulation in vivo. *The Journal of Immunology* *187*, 1411–1420.
- van Dommelen, S.L.H., Tabarias, H.A., Smyth, M.J., and Degli-Esposti, M.A. (2003). Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J. Virol.* *77*, 1877–1884.
- Vasquez, R.E., Xin, L., and Soong, L. (2008). Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun.* *76*, 161–169.
- Venkataraman, C., Leung, S., Salvekar, A., Mano, H., and Schindler, U. (1999). Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation. *J. Immunol.* *162*, 4053–4061.
- Vestergaard, C., Bang, K., Gesser, B., Yoneyama, H., Matsushima, K., and Larsen, C.G. (2000). A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest. Dermatol.* *115*, 640–646.
- Vestergaard, C., Kirstejn, N., Gesser, B., Mortensen, J.T., Matsushima, K., and Larsen, C.G. (2001). IL-10 augments the IFN-gamma and TNF-alpha induced TARC production in HaCaT cells: a possible mechanism in the inflammatory reaction of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* *26*, 46–54.
- Vijayanand, P., Durkin, K., Hartmann, G., Morjaria, J., Seumois, G., Staples, K.J., Hall, D., Bessant, C., Bartholomew, M., Howarth, P.H., et al. (2010). Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *The Journal of Immunology* *184*, 4568–4574.

- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* *176*, 47–58.
- Vulcano, M., Albanesi, C., Stoppacciaro, A., Bagnati, R., D'Amico, G., Struyf, S., Transidico, P., Bonocchi, R., Del Prete, A., Allavena, P., et al. (2001). Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* *31*, 812–822.
- Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N., and Carsetti, R. (2002). B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* *195*, 771–780.
- Watanabe, T., Asano, N., Kitani, A., Fuss, I.J., Chiba, T., and Strober, W. (2010). NOD1-Mediated Mucosal Host Defense against *Helicobacter pylori*. *Int J Inflam* *2010*, 476482.
- Weber, C., Meiler, S., Döring, Y., Koch, M., Drechsler, M., Megens, R.T.A., Rowinska, Z., Bidzhekov, K., Fecher, C., Ribechini, E., et al. (2011). CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J. Clin. Invest.*
- Weihrauch, M.R., Manzke, O., Beyer, M., Haverkamp, H., Diehl, V., Bohlen, H., Wolf, J., and Schultze, J.L. (2005). Elevated serum levels of CC thymus and activation-related chemokine (TARC) in primary Hodgkin's disease: potential for a prognostic factor. *Cancer Res.* *65*, 5516–5519.
- Whiting, D., Hsieh, G., Yun, J.J., Banerji, A., Yao, W., Fishbein, M.C., Belperio, J., Strieter, R.M., Bonavida, B., and Ardehali, A. (2004). Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J. Immunol.* *172*, 7417–7424.
- Widhe, M., Jarefors, S., Ekerfelt, C., Vrethem, M., Bergstrom, S., Forsberg, P., and Ernerudh, J. (2004). Borrelia-specific interferon-gamma and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *J. Infect. Dis.* *189*, 1881–1891.
- Williams, A.E. (2008). Functional aspects of animal microRNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 545–562.
- Wirnsberger, G., Hebenstreit, D., Posselt, G., Horejs-Hoeck, J., and Duschl, A. (2006). IL-4 induces expression of TARC/CCL17 via two STAT6 binding sites. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1882–1891.
- Wu, R., Cui, X., Dong, W., Zhou, M., Simms, H.H., and Wang, P. (2006). Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells via AhR pathway: the central role of proinflammatory cytokines. *Int. J. Mol. Med.* *18*, 339–346.
- Xiao, T., Fujita, H., Saeki, H., Mitsui, H., Sugaya, M., Tada, Y., Kakinuma, T., Torii, H., Nakamura, K., Asahina, A., et al. (2003a). 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*, 126–132.
- Xiao, T., Kagami, S., Saeki, H., Sugaya, M., Kakinuma, T., Fujita, H., Yano, S., Mitsui, H., Torii, H., Komine, M., et al. (2003b). Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-alpha and IFN-gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.* *31*, 111–117.

- Yamaguchi, Y., Motoki, K., Ueno, H., Maeda, K., Kobayashi, E., Inoue, H., Fukushima, H., and Koezuka, Y. (1996). Enhancing effects of (2S,3S,4R)-1-O-(alpha-D-galactopyranosyl)-2-(N-hexacosanoylamino)-1,3,4-octadecanetriol (KRN7000) on antigen-presenting function of antigen-presenting cells and antimetastatic activity of KRN7000-pretreated antigen-presenting cells. *Oncol. Res.* *8*, 399–407.
- Yamazaki, S., and Steinman, R.M. (2009). Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J. Dermatol. Sci.* *54*, 69–75.
- Yanai, M., Sato, K., Aoki, N., Takiyama, Y., Oikawa, K., Kobayashi, H., Kimura, S., Harabuchi, Y., and Tateno, M. (2007). The role of CCL22/macrophage-derived chemokine in allergic rhinitis. *Clin. Immunol.* *125*, 291–298.
- Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., et al. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.* *4*, 551–556.
- Yrlid, U., Cerovic, V., Milling, S., Jenkins, C.D., Klavinskis, L.S., and MacPherson, G.G. (2006). A distinct subset of intestinal dendritic cells responds selectively to oral TLR7/8 stimulation. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2639–2648.
- Yu, B., Koga, T., Urabe, K., Moroi, Y., Maeda, S., Yanagihara, Y., and Furue, M. (2002a). Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF-alpha and IFN-gamma in human keratinocyte and fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* *30*, 29–36.
- Yu, C.-R., Mahdi, R.R., Oh, H.-M., Amadi-Obi, A., Levy-Clarke, G., Burton, J., Eseonu, A., Lee, Y., Chan, C.-C., and Egwuagu, C.E. (2011). Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) inhibits lymphocyte recruitment into the retina and protects SOCS1 transgenic rats and mice from ocular inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 6978–6986.
- Yu, P., Wang, Y., Chin, R.K., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., Kosco-Vibois, M.H., Cyster, J., and Fu, Y.-X. (2002b). B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *J. Immunol.* *168*, 5117–5123.
- Zakharova, M., and Ziegler, H.K. (2005). Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* *175*, 5024–5033.
- Zantl, N., Uebe, A., Neumann, B., Wagner, H., Siewert, J.R., Holzmann, B., Heidecke, C.D., and Pfeffer, K. (1998). Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect. Immun.* *66*, 2300–2309.
- Zhan, Y., Carrington, E.M., van Nieuwenhuijze, A., Bedoui, S., Seah, S., Xu, Y., Wang, N., Mintern, J.D., Villadangos, J.A., Wicks, I.P., et al. (2011). GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8+ spleen dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2585–2595.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121–127.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Irmgard Förster für die Möglichkeit, diese Dissertation am Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung anfertigen zu können, sowie für Überlassung des Themas und ihre kontinuierliche Förderung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Proksch danke ich für die freundliche Betreuung und die Übernahme des Gutachtens von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Sehr wertvoll war die Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer vom Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene an der Universität Düsseldorf, der mir die Nutzung des Zellsorters in seinem Institut ermöglicht hat. Ein großes Dankeschön auch an die MiBis Dr. Daniel Degrandi und Dr. Philipp Dresing für zahlreiche und endlose Stunden am Sorter.

Großen Anteil hatten Ratschläge, Diskussionen und Hilfsbereitschaft von Frau PD Dr. Heike Weighardt in der Entstehung dieser Arbeit.

Weiterhin ein großes Dankeschön an meine Kollegen für die produktive Zusammenarbeit.

Abschließend danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung, Rückhalt und Geduld!

## 9. Anhang

### 9.1. Daten der mRNA-Expressionsanalyse

Tabelle 4: Liste aller differentiell exprimierten Gene mit einem  $\Delta$ -Wert  $\geq 2$  (unter Auslassung von unbekanntem und RIKEN-Genen). Der  $\Delta$ -Wert gibt an, wievielfach mehr bzw. weniger ein Gen in CCL17<sup>+</sup> LK-DC verglichen mit CCL17<sup>-</sup> Milz-DC exprimiert ist.

Symbol	Gen	$\Delta$
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-18
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	-13,93
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-9,82
E430029J22Rik	RIKEN cDNA E430029J22 gene	-7,26
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	-7,03
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	-6,74
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-6,72
Ube2e2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	-6,72
Tagap	T-cell activation Rho GTPase-activating protein	-6,69
Adam11	a disintegrin and metalloproteinase domain 11	-6,36
Tagap	T-cell activation Rho GTPase-activating protein	-6,32
Ryr3	ryanodine receptor 3	-6,25
Upp1	uridine phosphorylase 1	-6,23
Spic	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	-6,11
Gpr18	G protein-coupled receptor 18	-5,94
Isg20	interferon-stimulated protein	-5,87
Dtx1	deltex 1 homolog (Drosophila)	-5,65
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	-5,64
Tagap	T-cell activation Rho GTPase-activating protein	-5,5
Tlr7	toll-like receptor 7	-5,5
A430084P05Rik	RIKEN cDNA A430084P05 gene	-5,3
Lag3	lymphocyte-activation gene 3	-5,29
OTTMUSG00000016644	predicted gene, OTTMUSG00000016644	-5,26
Vps37b	vacuolar protein sorting 37B (yeast)	-5,25
Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	-5,23
Pstpip1	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1	-5,09
Sema4f	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), TM domain, and short cytoplasmic domain	-5,05
Egr1	early growth response 1	-4,96
Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	-4,89
A530023O14Rik	RIKEN cDNA A530023O14 gene	-4,85
Lrrc33	leucine rich repeat containing 33	-4,8
Igtp	interferon gamma induced GTPase	-4,8
Soat2	sterol O-acyltransferase 2	-4,77
Tpst1	protein-tyrosine sulfotransferase 1	-4,75
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	-4,73
5031414D18Rik	RIKEN cDNA 5031414D18 gene	-4,68
Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain	-4,65
Ier3	immediate early response 3	-4,65
Spic	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	-4,52

Symbol	Gen	Δ
Tbx21	T-box 21	-4,51
Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	-4,44
Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	-4,44
5031414D18Rik	RIKEN cDNA 5031414D18 gene	-4,41
Cmpk2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	-4,37
A530023O14Rik	RIKEN cDNA A530023O14 gene	-4,35
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	-4,33
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	-4,33
Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	-4,3
Kif23	kinesin family member 23	-4,3
Cd86	CD86 antigen	-4,29
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	-4,27
Sct	secretin	-4,14
Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	-4,07
Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV	-4,06
Upp1	uridine phosphorylase 1	-4
Adrb2	adrenergic receptor, beta 2	-3,94
A530023O14Rik	RIKEN cDNA A530023O14 gene	-3,93
Ifi44	interferon-induced protein 44	-3,9
Ptpro	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	-3,88
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	-3,85
Lrp8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	-3,83
Upp1	uridine phosphorylase 1	-3,83
Pira6	paired-Ig-like receptor A6	-3,82
Pml	promyelocytic leukemia	-3,81
Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	-3,8
Tpst2	protein-tyrosine sulfotransferase 2	-3,78
Cxcr5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	-3,77
E2f2	E2F transcription factor 2	-3,75
Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	-3,73
Neurl	neuralized-like homolog (Drosophila)	-3,73
Adam11	a disintegrin and metallopeptidase domain 11	-3,72
Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	-3,72
Nupr1	nuclear protein 1	-3,72
Nrap	nebulin-related anchoring protein	-3,71
Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	-3,67
Tpst2	protein-tyrosine sulfotransferase 2	-3,64
Cyp4f16	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 16	-3,6
Flot1	flotillin 1	-3,6
Pml	promyelocytic leukemia	-3,58
LOC675594	similar to very large inducible GTPase 1 isoform A	-3,55
Osm	oncostatin M	-3,54
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	-3,53
Il12rb2	interleukin 12 receptor, beta 2	-3,5
Ccl2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	-3,48
EG240921	predicted gene, EG240921	-3,48
Satb1	special AT-rich sequence binding protein 1	-3,47
Irgm	immunity-related GTPase family, M	-3,46
Itgb7	integrin beta 7	-3,46

Symbol	Gen	Δ
LOC625360	similar to 2-cell-stage, variable group, member 3	-3,43
Gpr171	G protein-coupled receptor 171	-3,41
LOC672511	hypothetical LOC672511	-3,39
Cd244	CD244 natural killer cell receptor 2B4	-3,39
Phc1	polyhomeotic-like 1 (Drosophila)	-3,39
5830405N20Rik	RIKEN cDNA 5830405N20 gene	-3,37
Ildr1	immunoglobulin-like domain containing receptor 1	-3,36
Irf7	interferon regulatory factor 7	-3,36
Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	-3,35
Dyrk3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	-3,33
Trim21	tripartite motif-containing 21	-3,28
Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	-3,27
Ckb	creatine kinase, brain	-3,26
Pscd4	pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 4	-3,26
Sh3bp2	SH3-domain binding protein 2	-3,24
Cd86	CD86 antigen	-3,21
Gbp6	guanylate binding protein 6	-3,21
Spag5	sperm associated antigen 5	-3,17
Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	-3,16
Phc1	polyhomeotic-like 1 (Drosophila)	-3,15
E2f2	E2F transcription factor 2	-3,14
Mefv	Mediterranean fever	-3,14
BC004728	cDNA sequence BC004728	-3,13
Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1	-3,12
Ffar2	free fatty acid receptor 2	-3,11
LOC667337	hypothetical LOC667337	-3,1
Cd80	CD80 antigen	-3,08
Cxcr5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	-3,07
Sucnr1	succinate receptor 1	-3,06
Cd86	CD86 antigen	-3,05
Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	-3,05
Arhgap25	Rho GTPase activating protein 25	-3,04
Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	-3,04
Gramd3	GRAM domain containing 3	-3,01
Ifi205	interferon activated gene 205	-3,01
Tmem2	transmembrane protein 2	-3
B4galt3	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 3	-2,99
Kif23	kinesin family member 23	-2,98
Gbp6	guanylate binding protein 6	-2,97
Ifi205	interferon activated gene 205	-2,96
Tgtp	T-cell specific GTPase	-2,96
Stat2	signal transducer and activator of transcription 2	-2,95
Tpd52	tumor protein D52	-2,95
Dpp10	dipeptidylpeptidase 10	-2,94
Grasp	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	-2,94
Cln3	ceroid lipofuscinosis, neuronal 3, juvenile (Batten, Spielmeyer-Vogt disease)	-2,92
I830077J02Rik	RIKEN cDNA I830077J02 gene	-2,92
BC094916	cDNA sequence BC094916	-2,91
D14Erttd668e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 668, expressed	-2,91

Symbol	Gen	Δ
Hdc	histidine decarboxylase	-2,91
Socs3	suppressor of cytokine signaling 3	-2,9
C130026I21Rik	RIKEN cDNA C130026I21 gene	-2,88
Hs6st1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1	-2,87
Il27	interleukin 27	-2,87
Trim6	tripartite motif-containing 6	-2,87
Ly6e	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	-2,86
Ifi203	interferon activated gene 203	-2,86
Sh2d1b1	SH2 domain protein 1B1	-2,86
Pira3	paired-Ig-like receptor A3	-2,85
Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3	-2,85
Illdr1	immunoglobulin-like domain containing receptor 1	-2,84
Nhsl1	NHS-like 1	-2,83
Gpr65	G-protein coupled receptor 65	-2,82
Hmgb2	high mobility group box 2	-2,82
Rtp4	receptor transporter protein 4	-2,82
Slfn1	schlafen 1	-2,82
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	-2,8
Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	-2,78
Lmnb1	lamin B1	-2,78
Slamf6	SLAM family member 6	-2,77
Nat5	N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )	-2,77
Pdyn	prodynorphin	-2,77
Trim30	tripartite motif-containing 30	-2,77
Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	-2,76
Rundc3b	RUN domain containing 3B	-2,76
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	-2,74
Oxct2b	3-oxoacid CoA transferase 2B	-2,73
Pira4	paired-Ig-like receptor A4	-2,73
Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	-2,72
Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3	-2,72
Apof	apolipoprotein F	-2,71
Timeless	timeless homolog ( <i>Drosophila</i> )	-2,71
Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	-2,7
4930589M24Rik	RIKEN cDNA 4930589M24 gene	-2,69
Sp100	nuclear antigen Sp100	-2,69
Cd276	CD276 antigen	-2,68
Cdca3	cell division cycle associated 3	-2,68
Rab3d	RAB3D, member RAS oncogene family	-2,68
Prc1	protein regulator of cytokinesis 1	-2,67
Rnf167	ring finger protein 167	-2,67
Slc29a3	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3	-2,67
Add3	adducin 3 (gamma)	-2,66
C130026I21Rik	RIKEN cDNA C130026I21 gene	-2,66
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	-2,66
Lrmp	lymphoid-restricted membrane protein	-2,65
Dnase113	deoxyribonuclease 1-like 3	-2,64
Ifngr1	interferon gamma receptor 1	-2,64
LOC435565	interferon-inducible GTPase-like	-2,63

Symbol	Gen	Δ
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	-2,62
Cd70	CD70 antigen	-2,61
Lysmd2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	-2,6
Asprv1	aspartic peptidase, retroviral-like 1	-2,59
Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier	-2,58
Morc3	microrchidia 3	-2,58
Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	-2,58
Sema4f	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), TM domain, and short cytoplasmic domain	-2,58
2310014L17Rik	RIKEN cDNA 2310014L17 gene	-2,57
Pkp3	plakophilin 3	-2,57
Ubd	ubiquitin D	-2,57
ligp2	interferon inducible GTPase 2	-2,56
Grasp	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	-2,56
Sp140	Sp140 nuclear body protein	-2,56
Mtap7	microtubule-associated protein 7	-2,55
Ppa1	pyrophosphatase (inorganic) 1	-2,55
Chn2	chimerin (chimaerin) 2	-2,54
Cnn3	calponin 3, acidic	-2,54
Gpr35	G protein-coupled receptor 35	-2,54
Sla	src-like adaptor	-2,54
Centb1	centaurin, beta 1	-2,53
Tex9	testis expressed gene 9	-2,52
Tfrc	transferrin receptor	-2,52
Btla	B and T lymphocyte associated	-2,49
Ifi205	interferon activated gene 205	-2,49
Cenpf	centromere protein F	-2,48
Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	-2,48
Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	-2,47
Plp2	proteolipid protein 2	-2,47
Prkcb1	protein kinase C, beta 1	-2,47
Fcer1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	-2,46
Ms4a4b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B	-2,46
A630077B13Rik	RIKEN cDNA A630077B13 gene	-2,45
Oas3	2'-5' oligoadenylate synthetase 3	-2,45
Cd53	CD53 antigen	-2,44
Gpr120	G protein-coupled receptor 120	-2,44
Arid5b	AT rich interactive domain 5B (Mrf1 like)	-2,43
Casp6	caspase 6	-2,43
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	-2,43
Daxx	Fas death domain-associated protein	-2,43
A930005I04Rik	RIKEN cDNA A930005I04 gene	-2,42
Anxa2	annexin A2	-2,42
Armxc2	armadillo repeat containing, X-linked 2	-2,41
Casp6	caspase 6	-2,41
Gpr146	G protein-coupled receptor 146	-2,41
Pacsin1	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	-2,41
Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3	-2,41
Capn2	calpain 2	-2,4
Cdc20	cell division cycle 20 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2,4

Symbol	Gen	Δ
Kif2c	kinesin family member 2C	-2,4
2700097O09Rik	RIKEN cDNA 2700097O09 gene	-2,39
Cdk5r1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit (p35) 1	-2,39
Gjb2	gap junction protein, beta 2	-2,39
Phf6	PHD finger protein 6	-2,38
Pira4	paired-Ig-like receptor A4	-2,38
Traf4	Tnf receptor associated factor 4	-2,38
Zbp1	Z-DNA binding protein 1	-2,38
Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	-2,37
Chmp4b	chromatin modifying protein 4B	-2,36
Ifi27	interferon, alpha-inducible protein 27	-2,36
Cd81	CD 81 antigen	-2,36
Usp6nl	USP6 N-terminal like	-2,36
B3gnt5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	-2,35
Cenpa	centromere protein A	-2,35
Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1	-2,35
Purg	purine-rich element binding protein G	-2,35
6430527G18Rik	RIKEN cDNA 6430527G18 gene	-2,34
Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5	-2,33
Unc84b	unc-84 homolog B (C. elegans)	-2,33
Hamp	hepcidin antimicrobial peptide	-2,33
Pla1a	phospholipase A1 member A	-2,33
Tpx2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	-2,33
Tha1	threonine aldolase 1	-2,32
Zcchc18	zinc finger, CCHC domain containing 18	-2,32
BC004728	cDNA sequence BC004728	-2,32
Ikzf1	IKAROS family zinc finger 1	-2,32
Psip1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	-2,32
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	-2,32
Slc44a2	solute carrier family 44, member 2	-2,31
2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 gene	-2,31
Kcnab1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	-2,31
Nrf1	nuclear respiratory factor 1	-2,31
Klri2	killer cell lectin-like receptor family I member 2	-2,3
Ndst1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	-2,3
Nampt	nicotinamide phosphoribosyltransferase	-2,3
Rfx1	regulatory factor X, 1 (influences HLA class II expression)	-2,3
Tspan17	tetraspanin 17	-2,3
Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	-2,29
Dhx57	DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57	-2,28
Lbr	lamin B receptor	-2,28
Nat5	N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, S. cerevisiae)	-2,28
Rnd3	Rho family GTPase 3	-2,27
Sgcb	sarcoglycan, beta (dystrophin-associated glycoprotein)	-2,27
Ppil3	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3	-2,26
Traf4	Tnf receptor associated factor 4	-2,26
Ggps1	geranylgeranyl diphosphate synthase 1	-2,25
Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	-2,24
AA467197	expressed sequence AA467197	-2,24

Symbol	Gen	Δ
Cdc42ep3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	-2,24
Tnf	tumor necrosis factor	-2,24
Pik3ap1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	-2,23
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	-2,23
Emp3	epithelial membrane protein 3	-2,23
Gch1	GTP cyclohydrolase 1	-2,23
Ifi205	interferon activated gene 205	-2,23
Arhgap15	Rho GTPase activating protein 15	-2,22
Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5	-2,22
Btg4	B-cell translocation gene 4	-2,22
Cass4	Cas scaffolding protein family member 4	-2,22
Fndc7	fibronectin type III domain containing 7	-2,22
Psip1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	-2,22
Rnf40	ring finger protein 40	-2,22
Prnp	prion protein	-2,21
Ccr6	chemokine (C-C motif) receptor 6	-2,2
Clspn	claspin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	-2,2
Hhex	hematopoietically expressed homeobox	-2,2
Pira4	paired-Ig-like receptor A4	-2,2
Sort1	sortilin 1	-2,2
Oas1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G	-2,19
Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	-2,19
Pla1a	phospholipase A1 member A	-2,19
Rbm43	RNA binding motif protein 43	-2,19
S100a4	S100 calcium binding protein A4	-2,19
Capn2	calpain 2	-2,18
Tmod2	tropomodulin 2	-2,18
Tnf	tumor necrosis factor	-2,18
Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha	-2,18
Zfp263	zinc finger protein 263	-2,18
Aire	autoimmune regulator	-2,17
Chst3	carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 3	-2,17
E130016E03Rik	RIKEN cDNA E130016E03 gene	-2,17
Evi2a	ecotropic viral integration site 2a	-2,17
Ndc80	NDC80 homolog, kinetochore complex component ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2,17
Troap	trophinin associated protein	-2,17
Cenpn	centromere protein N	-2,16
Sipa1l1	signal-induced proliferation-associated 1 like 1	-2,16
Capn2	calpain 2	-2,15
Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	-2,15
Dusp2	dual specificity phosphatase 2	-2,15
Mlkl	mixed lineage kinase domain-like	-2,15
Tmem2	transmembrane protein 2	-2,15
Eps8l2	EPS8-like 2	-2,14
Plp2	proteolipid protein 2	-2,14
Sort1	sortilin 1	-2,13
Stard5	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5	-2,13
Cldnd1	claudin domain containing 1	-2,12
Fem1c	fem-1 homolog c ( <i>C.elegans</i> )	-2,12

Symbol	Gen	Δ
Mcm10	minichromosome maintenance deficient 10 ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2,12
Ubac2	ubiquitin associated domain containing 2	-2,12
1700041B20Rik	RIKEN cDNA 1700041B20 gene	-2,11
Acss1	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	-2,11
Cldn10	claudin 10	-2,11
Gpr141	G protein-coupled receptor 141	-2,11
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	-2,11
Rilpl1	Rab interacting lysosomal protein-like 1	-2,1
Centd1	centaurin, delta 1	-2,1
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	-2,1
Tk1	thymidine kinase 1	-2,1
Tor3a	torsin family 3, member A	-2,1
Dock9	dedicator of cytokinesis 9	-2,09
A230050P20Rik	RIKEN cDNA A230050P20 gene	-2,09
Prps1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	-2,09
C330023M02Rik	RIKEN cDNA C330023M02 gene	-2,08
Cygb	cytoglobin	-2,08
Mapk13	mitogen-activated protein kinase 13	-2,08
Med23	mediator complex subunit 23	-2,07
9330175E14Rik	RIKEN cDNA 9330175E14 gene	-2,07
Unc84b	unc-84 homolog B ( <i>C. elegans</i> )	-2,07
Pbk	PDZ binding kinase	-2,07
Per1	period homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	-2,07
Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	-2,07
Unc84b	unc-84 homolog B ( <i>C. elegans</i> )	-2,07
Clspn	claspin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	-2,06
Darc	Duffy blood group, chemokine receptor	-2,06
Ranbp2	RAN binding protein 2	-2,05
Cdc20	cell division cycle 20 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2,05
Ndst1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	-2,05
Ticam2	toll-like receptor adaptor molecule 2	-2,05
Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-2,04
Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5	-2,04
Il18rap	interleukin 18 receptor accessory protein	-2,04
Kif22	kinesin family member 22	-2,04
Mycl1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)	-2,04
Pik3cb	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	-2,04
BC006779	cDNA sequence BC006779	-2,03
Hps3	Hermansky-Pudlak syndrome 3 homolog (human)	-2,03
Mfsd7	major facilitator superfamily domain containing 7	-2,03
Nrm	nurim (nuclear envelope membrane protein)	-2,03
Usp6nl	USP6 N-terminal like	-2,03
Ears2	glutamyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)	-2,02
Abca3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	-2,02
Tob2	transducer of ERBB2, 2	-2,02
Ccnd3	cyclin D3	-2,02
Fem1c	fem-1 homolog c ( <i>C.elegans</i> )	-2,02
Hps3	Hermansky-Pudlak syndrome 3 homolog (human)	-2,02
Ubl3	ubiquitin-like 3	-2,02

Symbol	Gen	Δ
Crispld2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	-2,01
9130404D14Rik	RIKEN cDNA 9130404D14 gene	-2,01
Evi2a	ecotropic viral integration site 2a	-2,01
Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1	-2,01
Ahi1	Abelson helper integration site 1	-2
EG432555	predicted gene, EG432555	-2
Pex11a	peroxisomal biogenesis factor 11a	-2
Plec1	plectin 1	-2
Tmpo	thymopoietin	-2
Parp12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	-2
BC016495	cDNA sequence BC016495	2
Mbtps1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	2
Ssh1	slingshot homolog 1 (Drosophila)	2,01
Tnni2	troponin I, skeletal, fast 2	2,01
Capg	capping protein (actin filament), gelsolin-like	2,02
Creld1	cysteine-rich with EGF-like domains 1	2,02
Pilra	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	2,02
Rassf2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2	2,02
Slc26a6	solute carrier family 26, member 6	2,02
Tmem39a	transmembrane protein 39a	2,03
Apoe	apolipoprotein E	2,03
B930006L02Rik	RIKEN cDNA B930006L02 gene	2,03
Gpi1	glucose phosphate isomerase 1	2,03
Litaf	LPS-induced TN factor	2,03
Scp2	sterol carrier protein 2, liver	2,03
Tnfsf13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	2,03
Zfp598	zinc finger protein 598	2,03
Ets2	E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain	2,04
Hsd3b7	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	2,04
Lipa	lysosomal acid lipase A	2,04
Mgat4b	mannoside acetylglucosaminyltransferase 4, isoenzyme B	2,04
Rras	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R	2,04
Arl5a	ADP-ribosylation factor-like 5A	2,05
1700047117Rik1	RIKEN cDNA 1700047117 gene 1	2,06
Snd1	staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1	2,06
Pnkd	paroxysmal nonkinesinogenic dyskinesia	2,06
Ilk	integrin linked kinase	2,06
App	amyloid beta (A4) precursor protein	2,07
Dbi	diazepam binding inhibitor	2,07
Khsrp	KH-type splicing regulatory protein	2,07
Tceb3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3	2,07
Vim	vimentin	2,07
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	2,08
Dstn	destrin	2,08
Hsd3b7	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	2,08
Scn2b	sodium channel, voltage-gated, type II, beta	2,08
Arhgef4	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	2,09
Pbxip1	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	2,09
Plat	plasminogen activator, tissue	2,09

Symbol	Gen	Δ
Slamf1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	2,09
Pcdh1	protocadherin 1	2,1
RP23-195K8.6	hypothetical protein LOC622404	2,1
Pxn	paxillin	2,1
Rasa2	RAS p21 protein activator 2	2,1
E030018N11Rik	RIKEN cDNA E030018N11 gene	2,1
Acp2	acid phosphatase 2, lysosomal	2,11
Tmcc3	transmembrane and coiled coil domains 3	2,11
Adfp	adipose differentiation related protein	2,12
Tpp1	tripeptidyl peptidase I	2,12
Got1	glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble	2,12
Gstt1	glutathione S-transferase, theta 1	2,12
Swap70	SWA-70 protein	2,12
Cib3	calcium and integrin binding family member 3	2,13
Gabarapl1	gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1	2,13
Lzts2	leucine zipper, putative tumor suppressor 2	2,13
Spr	sepiapterin reductase	2,13
Wdr6	WD repeat domain 6	2,13
Txndc15	thioredoxin domain containing 15	2,14
Atmin	ATM interactor	2,14
Csf2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	2,14
D130040H23Rik	RIKEN cDNA D130040H23 gene	2,14
Oosp1	oocyte secreted protein 1	2,14
Prdx3	peroxiredoxin 3	2,14
Ntng2	netrin G2	2,15
Frm4a	FERM domain containing 4A	2,15
E230029C05Rik	RIKEN cDNA E230029C05 gene	2,15
Hist1h1c	histone cluster 1, H1c	2,15
Ccdc50	coiled-coil domain containing 50	2,16
Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	2,16
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	2,17
Khk	ketohexokinase	2,17
Pop5	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP family ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,17
Serp1n6b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b	2,17
Tnfrsf9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	2,17
Aspscr1	alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1 (human)	2,18
Dhrs1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	2,18
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	2,21
Arhgap22	Rho GTPase activating protein 22	2,21
Dapk2	death-associated kinase 2	2,21
Fnbp1	formin binding protein 1	2,21
Hexa	hexosaminidase A	2,21
9830001H06Rik	RIKEN cDNA 9830001H06 gene	2,22
Adam19	a disintegrin and metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)	2,22
Myom1	myomesin 1	2,22
Preb	prolactin regulatory element binding	2,22
Slc25a20	solute carrier family 25 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	2,22
Rftn1	raftlin lipid raft linker 1	2,23
Alg2	asparagine-linked glycosylation 2 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase)	2,23

Symbol	Gen	Δ
EG622339	predicted gene, EG622339	2,23
Pgcp	plasma glutamate carboxypeptidase	2,23
Slc4a8	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 8	2,23
Dclk2	doublecortin-like kinase 2	2,24
Dnajc1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	2,24
Zfp524	zinc finger protein 524	2,24
Bag3	Bcl2-associated athanogene 3	2,25
Ensa	endosulfine alpha	2,25
Slc25a20	solute carrier family 25 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	2,25
Tubb6	tubulin, beta 6	2,26
Cd209c	CD209c antigen	2,26
Esam1	endothelial cell-specific adhesion molecule	2,26
Ldlr	low density lipoprotein receptor	2,26
Sepsecs	Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec (selenocysteine) tRNA synthase	2,27
3110049J23Rik	RIKEN cDNA 3110049J23 gene	2,28
Atmin	ATM interactor	2,28
Dap	death-associated protein	2,28
Hist2h2aa1	histone cluster 2, H2aa1	2,28
Rnaset2b	ribonuclease T2B	2,28
Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	2,29
Hlx	H2.0-like homeobox	2,29
Ncoa4	nuclear receptor coactivator 4	2,29
Rbm14	RNA binding motif protein 14	2,29
Ero1b	ERO1-like beta ( <i>S. cerevisiae</i> )	2,3
Palld	palladin, cytoskeletal associated protein	2,3
Alg2	asparagine-linked glycosylation 2 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase)	2,31
Arl5c	ADP-ribosylation factor-like 5C	2,31
Frag1	FGF receptor activating protein 1	2,31
Pdgfb	platelet derived growth factor, B polypeptide	2,31
Rab32	RAB32, member RAS oncogene family	2,31
Rgs3	regulator of G-protein signaling 3	2,31
D130040H23Rik	RIKEN cDNA D130040H23 gene	2,32
Dbi	diazepam binding inhibitor	2,32
Nr2f6	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	2,32
Gpr68	G protein-coupled receptor 68	2,33
Scp2	sterol carrier protein 2, liver	2,33
Nipa1	non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1 homolog (human)	2,34
Sesn2	sestrin 2	2,34
Ugt1a10	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A10	2,34
Mbtps1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	2,35
Plek2	pleckstrin 2	2,35
Ssx2ip	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	2,36
Swap70	SWA-70 protein	2,37
Adamtsl4	ADAMTS-like 4	2,38
4930572J05Rik	RIKEN cDNA 4930572J05 gene	2,39
Lass5	LAG1 homolog, ceramide synthase 5	2,39
App	amyloid beta (A4) precursor protein	2,4
Nr1h3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	2,4
Lime1	Lck interacting transmembrane adaptor 1	2,41

Symbol	Gen	Δ
Sh3pxd2b	SH3 and PX domains 2B	2,41
Cd9	CD9 antigen	2,42
Dapk1	death associated protein kinase 1	2,42
Itgae	integrin, alpha E, epithelial-associated	2,42
Mospd1	motile sperm domain containing 1	2,42
Slc22a21	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 21	2,42
Stab1	stabilin 1	2,43
Hist1h1c	histone cluster 1, H1c	2,43
Lepre1	leprecan 1	2,43
Ptk6	PTK6 protein tyrosine kinase 6	2,43
Tyk2	tyrosine kinase 2	2,43
Dbndd2	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 2	2,44
Frap1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	2,44
Gnl2	guanine nucleotide binding protein-like 2 (nucleolar)	2,44
App	amyloid beta (A4) precursor protein	2,44
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	2,45
Hcn3	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 3	2,48
Nxn	nucleoredoxin	2,48
Crim2	cysteine rich BMP regulator 2 (chordin like)	2,49
2310061C15Rik	RIKEN cDNA 2310061C15 gene	2,5
Ampd2	adenosine monophosphate deaminase 2 (isoform L)	2,5
Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	2,5
Cd209b	CD209b antigen	2,51
Gspt2	G1 to S phase transition 2	2,51
Stard4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4	2,51
Rasd2	RASD family, member 2	2,54
Tnfrsf18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	2,55
Tbc1d13	TBC1 domain family, member 13	2,56
Mtmr4	myotubularin related protein 4	2,57
St3gal3	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	2,58
Adam8	a disintegrin and metallopeptidase domain 8	2,59
Mbp	myelin basic protein	2,59
Mocos	molybdenum cofactor sulfurase	2,59
Rhbdf1	rhomboid family 1 (Drosophila)	2,59
Tnfrsf18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	2,59
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	2,6
Cstb	cystatin B	2,6
Gusb	glucuronidase, beta	2,6
Idh1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	2,6
Nans	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	2,6
Stap2	signal transducing adaptor family member 2	2,61
Sqle	squalene epoxidase	2,61
Zfp523	zinc finger protein 523	2,61
Swap70	SWA-70 protein	2,62
Gusb	glucuronidase, beta	2,63
Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	2,63
Aif1	allograft inflammatory factor 1	2,64
Dcxr	dicarbonyl L-xylulose reductase	2,64
Hagh	hydroxyacyl glutathione hydrolase	2,64

Symbol	Gen	Δ
Gpr137b	G protein-coupled receptor 137B	2,66
Mgl2	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2	2,66
Klk8	kallikrein related-peptidase 8	2,66
Casp3	caspase 3	2,67
Sepsecs	Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec (selenocysteine) tRNA synthase	2,67
Pla2g7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	2,67
Tns4	tensin 4	2,68
Spint1	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	2,68
Chst7	carbohydrate (N-acetylglucosamino) sulfotransferase 7	2,69
Fer1l3	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	2,7
Cd44	CD44 antigen	2,71
Sh3pxd2b	SH3 and PX domains 2B	2,71
Pvr	poliovirus receptor	2,71
Endod1	endonuclease domain containing 1	2,72
Ltc4s	leukotriene C4 synthase	2,72
Large	like-glycosyltransferase	2,73
Tnfrsf4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	2,73
Ugt1a6b	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6B	2,73
Aldoa	aldolase 1, A isoform	2,74
Slc22a5	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5	2,74
Saa3	serum amyloid A 3	2,77
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	2,78
Tmem8	transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)	2,78
Aspscr1	alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1 (human)	2,79
Slc25a10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, dicarboxylate transporter), member 10	2,8
Dapk1	death associated protein kinase 1	2,81
Suox	sulfite oxidase	2,81
Dpysl5	dihydropyrimidinase-like 5	2,83
Ncoa4	nuclear receptor coactivator 4	2,84
Tmem120b	transmembrane protein 120B	2,85
S100a1	S100 calcium binding protein A1	2,85
Stx3	syntaxin 3	2,86
Aif1	allograft inflammatory factor 1	2,87
Zdhhc14	zinc finger, DHHC domain containing 14	2,87
H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2	2,88
Sav1	salvador homolog 1 (Drosophila)	2,88
Gnl2	guanine nucleotide binding protein-like 2 (nucleolar)	2,89
Ugt1a7c	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7C	2,89
Fnbp1l	formin binding protein 1-like	2,9
Slc4a8	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 8	2,9
Cd44	CD44 antigen	2,91
Scara3	scavenger receptor class A, member 3	2,91
Cyp51	cytochrome P450, family 51	2,92
Atp6v0a1	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit A1	2,94
Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	2,94
Gp49a	glycoprotein 49 A	2,94
1200009I06Rik	RIKEN cDNA 1200009I06 gene	2,95
Cd1d1	CD1d1 antigen	2,95
Pvr	poliovirus receptor	2,95

Symbol	Gen	Δ
Tpbg	trophoblast glycoprotein	2,95
Arsa	arylsulfatase A	2,96
Sh2d5	SH2 domain containing 5	2,96
Rgs10	regulator of G-protein signalling 10	2,97
2310005E10Rik	RIKEN cDNA 2310005E10 gene	3
Pex26	peroxisome biogenesis factor 26	3,01
Abhd14b	abhydrolase domain containing 14b	3,01
Daglb	diacylglycerol lipase, beta	3,01
Gal3st2	galactose-3-O-sulfotransferase 2	3,01
Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	3,03
Cysltr1	cysteinyl leukotriene receptor 1	3,04
Slc22a5	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5	3,04
C1qbp	complement component 1, q subcomponent binding protein	3,07
Centd3	centaurin, delta 3	3,08
Gp49a	glycoprotein 49 A	3,08
Traf5	Tnf receptor-associated factor 5	3,1
Htra1	HtrA serine peptidase 1	3,11
Pdcd1lg2	programmed cell death 1 ligand 2	3,11
Phkg1	phosphorylase kinase gamma 1	3,11
Sh3pxd2b	SH3 and PX domains 2B	3,12
Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase	3,12
Lxn	latexin	3,13
Pvrl2	poliovirus receptor-related 2	3,13
Cpne2	copine II	3,15
Htra1	HtrA serine peptidase 1	3,16
P2rx5	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	3,17
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	3,19
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	3,19
Noxo1	NADPH oxidase organizer 1	3,2
Pvrl2	poliovirus receptor-related 2	3,21
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3,23
Nid2	nidogen 2	3,24
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	3,24
Crip2	cysteine rich protein 2	3,29
2510009E07Rik	RIKEN cDNA 2510009E07 gene	3,29
Pou4f1	POU domain, class 4, transcription factor 1	3,31
Tnfrsf9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	3,32
Lyz1	lysozyme 1	3,37
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3,42
Tmem8	transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)	3,43
Hist1h2bc	histone cluster 1, H2bc	3,47
Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	3,49
Palm	paralemmin	3,5
Pik3r3	phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55)	3,5
St5	suppression of tumorigenicity 5	3,53
Dcxr	dicarbonyl L-xylulose reductase	3,54
Gp2	glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	3,58
Nid2	nidogen 2	3,58
Slc25a29	solute carrier family 25, member 29	3,58

Symbol	Gen	Δ
Sqle	squalene epoxidase	3,61
Itgae	integrin, alpha E, epithelial-associated	3,64
Thy1	thymus cell antigen 1, theta	3,69
Ccdc120	coiled-coil domain containing 120	3,72
Pygl	liver glycogen phosphorylase	3,73
Hopx	HOP homeobox	3,77
Extl1	exostoses (multiple)-like 1	3,77
Tpm2	tropomyosin 2, beta	3,79
Dvl1	dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	3,82
Gfer	growth factor, erv1 (S. cerevisiae)-like (augmenter of liver regeneration)	3,83
2310046K01Rik	RIKEN cDNA 2310046K01 gene	3,87
Stap2	signal transducing adaptor family member 2	3,96
Mospd1	motile sperm domain containing 1	3,97
Zmynd15	zinc finger, MYND-type containing 15	3,98
Rhoc	ras homolog gene family, member C	4,07
Mylk	myosin, light polypeptide kinase	4,14
Extl1	exostoses (multiple)-like 1	4,19
Nans	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	4,21
Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	4,25
Pltp	phospholipid transfer protein	4,26
Rhof	ras homolog gene family, member f	4,28
Dnahc2	dynein, axonemal, heavy chain 2	4,3
Lad1	ladinin	4,31
Gsto1	glutathione S-transferase omega 1	4,33
Pygl	liver glycogen phosphorylase	4,35
Csf2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	4,39
Ahrr	aryl-hydrocarbon receptor repressor	4,47
Cgnl1	cingulin-like 1	4,56
Pcbp4	poly(rC) binding protein 4	4,56
F11r	F11 receptor	4,57
Itgae	integrin, alpha E, epithelial-associated	4,59
Palld	palladin, cytoskeletal associated protein	4,61
Eno3	enolase 3, beta muscle	4,73
Mylk	myosin, light polypeptide kinase	4,76
Cdh26	cadherin-like 26	4,81
Mmp23	matrix metalloproteinase 23	4,85
Mylk	myosin, light polypeptide kinase	4,85
D0H4S114	DNA segment, human D4S114	4,86
Scn4b	sodium channel, type IV, beta	4,96
Lyz2	lysozyme 2	5
Fnbp1	formin binding protein 1	5,01
Net1	neuroepithelial cell transforming gene 1	5,04
Mras	muscle and microspikes RAS	5,06
Tmem86a	transmembrane protein 86A	5,21
Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	5,31
Osbpl3	oxysterol binding protein-like 3	5,42
St5	suppression of tumorigenicity 5	5,42
Fnbp1	formin binding protein 1	5,43
Lyz2	lysozyme 2	5,48

Symbol	Gen	Δ
Lima1	LIM domain and actin binding 1	5,73
Fndc5	fibronectin type III domain containing 5	5,82
Lima1	LIM domain and actin binding 1	5,95
Sema6d	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D	5,95
Net1	neuroepithelial cell transforming gene 1	6,02
Lyz1	lysozyme 1	6,34
Osbpl3	oxysterol binding protein-like 3	6,35
Stra6	stimulated by retinoic acid gene 6	6,46
Slc22a4	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	6,58
Fndc5	fibronectin type III domain containing 5	6,67
Fndc5	fibronectin type III domain containing 5	6,7
Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein	7,09
Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	7,2
5430432M24Rik	RIKEN cDNA 5430432M24 gene	7,51
Car2	carbonic anhydrase 2	7,6
Apol7c	apolipoprotein L 7c	7,75
Apol10b	apolipoprotein L 10b	7,95
4922503N01Rik	RIKEN cDNA 4922503N01 gene	7,98
Lyz1	lysozyme 1	8,07
Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	9,21
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	9,63
Slc9a3r2	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 2	11,49
Itgae	integrin, alpha E, epithelial-associated	12,17
2510009E07Rik	RIKEN cDNA 2510009E07 gene	12,62
Itgae	integrin, alpha E, epithelial-associated	13,14
Syng3	synaptogyrin 3	13,86
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	14,19
2510009E07Rik	RIKEN cDNA 2510009E07 gene	15,62
Ppp1r1a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	15,64
4922503N01Rik	RIKEN cDNA 4922503N01 gene	15,86
Clu	clusterin	19,28
Aqp9	aquaporin 9	19,7
Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	44,41



### **9.3. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe und diese Dissertation in vorliegender oder ähnlicher Form in keiner anderen Institution eingereicht habe.

Düsseldorf, den 17.04.2012

Theresa Globisch