Untersuchung zur wechselseitigen Beeinflussung von Chemotaxinen und Dendritischen Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Claudia Dettmer-Richardt
aus Mühlhausen

Göttingen 2007

D 7
Referent: Herr Prof. Dr. Rüdiger Hardeland
Koreferent: Herr Prof. Dr. Wolfgang Liebl
Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2008

Für Jana

INHALTSVERZEICHNIS

I. DANKSAGUNG	**IV**
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	**V**
1. EINLEITUNG	**1**
1.1. Die Dendritische Zelle	**1**
1.1.1. Entwicklung und Funktion der Dendritischen Zelle	1
1.1.2. Migration Dendritischer Zellen	2
1.1.3. Einfluss von GM-CSF und IL-4 auf die Ausdifferenzierung von myeloiden Dendritischen Zellen	2
1.1.4. Überblick über die Rolle von IL-4 im Immunsystem	3
1.1.5. Prostaglandin E_2 in der Immunantwort und sein Einfluss auf Dendritische Zellen	4
1.2. Rezeptoren	**6**
1.2.1. Cytokinrezeptoren	6
1.2.1.1. Der IL-4-Rezeptor: Signalgebung und biologische Funktionen	6
1.2.1.1.1. Die Struktur des IL-4-Rezeptors	6
1.2.1.1.2. Aktivierung der Signaltransduktion durch den IL-4-Rezeptor	8
1.2.1.1.3. Der IRS-1/2-Signalweg	9
1.2.1.1.4. Die Aktivierung von STAT6	11
1.2.1.1.5. Modulation der IL-4-Rezeptorsignalwege	13
1.2.1.1.5.1. Die Rolle von Phospho-Tyrosin-Phosphatasen	13
1.2.1.1.5.2. Negative Regulation des JAK/STAT-Weges	14
1.2.1.2. Der IL-13-Rezeptor	15
1.2.2. Sieben-Helix-Rezeptoren (Serpentinrezeptoren)	16
1.2.2.1. Charakteristika	16
1.2.2.2. Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren	19
1.2.2.3. Chemokine und ihre Rezeptoren	20
1.3. Problemstellung	**23**
2. MATERIAL UND METHODEN	**25**
2.1. Material	**25**
2.1.1. Medien, Seren, Puffer	25
2.1.2. Medienzusätze, Cytokine, Chemokine, Anaphylatoxine	26
2.1.3. Reagenzien, Testkitts, Chemikalien	27
2.1.4. Kulturgefäße, Pipetten und andere Materialien	28
2.1.5. Tierversuche	28
2.1.6. Laborgeräte	29
2.1.7. Computersoftware	30
2.2. Methoden	**31**
2.2.1. Kultivierung von humanen Zellen	31
2.2.1.1. Isolierung von $CD34^{\pm}$ hämatopoetischen Vorläuferzellen	31
2.2.1.2. Leukaphereseaufarbeitung	33

2.2.1.3. Gewinnung von Monozyten durch Adhärenz und ihre Kultivierung	34
2.2.1.4. Kulturzusätze im humanen System	36
2.2.1.5. Kryokonservierung	37
2.2.1.5.1. Einfrieren von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut	37
2.2.1.5.2. Auftauen von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut	38
2.2.1.6. Vitalitätstest	38
2.2.1.7. Ernte der Zellen aus Leukapherese	39
2.2.1.8. Ernte der aus Nabelschnurblut generierten Zellen	39
2.2.2. Kultivierung von Mauszellen	40
2.2.2.1. Gewinnung, Kultivierung und Ernte von Mausknochenmarkszellen	40
2.2.2.2. Kulturzusätze im Maussystem	41
2.2.3. Zellbiologie	42
2.2.3.1. FACS-Färbung	42
2.2.3.1.1. Direkte Färbung membranständiger Antigene	44
2.2.3.1.2. Indirekte Färbung membranständiger Antigene	44
2.2.3.2. PKH26-Färbung	45
2.2.3.3. Messung der Ca^{2+}-Freisetzung	45
2.2.3.4. Cytospin	47
2.2.3.5. Färbung der Cytospins	47
2.2.3.6. Chemotaxis	48
2.2.3.6.1. Chemotaxis *in vitro*	48
2.2.3.6.2. Chemotaxis *in vivo*	49
2.2.3.6.3. Peritoneallavage	51
2.3. Statistik	51
3. ERGEBNISSE	**52**
3.1. Rezeptorexpression und Chemotaxis im murinen System	**52**
3.1.1. Der Einfluss von IL-4 und IL-13 auf Anaphylatoxinrezeptoren im murinen System	52
3.1.2. Die *in vivo* Migration gegen einen Liganden ist zeit- und dosisabhängig	55
3.1.3. Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT6 in der Expression von Anaphylatoxinrezeptoren	56
3.1.4. Einsatz von Inhibitoren zur Klärung der Beteiligung von Signalmolekülen	57
3.1.5. Einfluss von IL-4 und IL-13 auf Chemokinrezeptoren im murinen System	59
3.1.6. Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT6 in der Expression von Chemokinrezeptoren	64
3.1.7. Einfluss von IL-4 auf den Calciuminflux von murinen DC	65
3.2. Rezeptorexpression und Chemotaxis im humanen System	**67**
3.2.1. Generierung von DC aus $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen	67
3.2.2. Einfluss von IL-4 und IL-13 auf Anaphylatoxinrezeptoren im humanen System	71
3.2.3. Einfluss von IL-4 auf Chemokinrezeptoren von humanen Monozyten und MoDC	73
3.2.4. Einfluss von PGE_2 auf chemotaktische Rezeptoren im humanen System	75
3.2.5 Einfluss von PGE_2 auf C5aR und CCR7 im SCID-Mausmodell	79
3.2.6. Einfluss von IL-4 und PGE_2 auf das Wanderungsverhalten von DC *in vitro*	82
3.2.7. Einfluss von IL-4 und PGE_2 auf den Calciuminflux in humanen DC	83

4. DISKUSSION	**86**
4.1. Expression und Funktionalität von Chemotaxinrezeptoren im murinen System	**86**
4.2. Expression und Funktionalität von Chemotaxinrezeptoren im humanen System	**88**
4.3. Der Einfluss von Prostaglandin E_2 auf Chemotaxinrezeptoren im humanen System	**90**
5. ZUSAMMENFASSUNG	**93**
6. LITERATURQUELLEN	**96**
7. LEBENSLAUF	**116**

I. DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. rer. nat. Afsaneh Soruri sowie Herrn Prof. Dr. med. Jörg Zwirner für die freundliche Überlassung meines Promotionsthemas und für ihre ständige Unterstützung meiner Arbeit und ihren Ansporn bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hardeland für seine Tätigkeit als Referent sowie Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für das Koreferat.

Ich danke den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Frau Dr. rer. nat. Jasmin Grigat, Frau Kerstin Eckelmann, Frau Olga Walter und Frau Jutta Wollenweber für die familiäre Atmosphäre, die freundschaftlichen Bande, die wir knüpfen konnten, und die ausgezeichnete persönliche Unterstützung. Weiterhin möchte ich auch Frau Dr. rer. nat. Ziba Kiafard für ihre wissenschaftliche Hilfe und Frau Amina Bassibas, Frau Ines Heine und Frau Gabi Sonntag für die technische Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihren Rückhalt in jeglicher Hinsicht. Meinem Mann, Herrn Marco Richardt, danke ich für sein Verständnis und seine Geduld, meinen Eltern, Frau Heidrun Dettmer und Herrn Dr. med. Martin Dettmer, und meinen Großeltern, Frau Ilse Apel und Herrn Herbert Apel, für ihre stete Unterstützung, meinem Bruder, Herrn Matthias Dettmer, für seinen technischen Support.

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BMDC	Bone marrow dendritic cells
BSA	Bovines Serumalbumin
CB	Cord blood (Nabelschnurblut)
CD	Cluster of differentiation
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Flt3 Ligand	FMS like Tyrosinkinase-3 Ligand
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
GM-CSF	Granulocyten/Monocyten-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen-Isotyp HLA Klasse II
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JNK	cJun N-terminale Kinase
KMDC	Knochenmarks-Dendritische Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
MACS®	magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Phospho-Kinase
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDC	Macrophage-Derived Chemokine
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha
MIP-3α	Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha

MIP-1β	Macrophage Inflammatory Protein-1 beta
MoDC	monocyte derived dendritic cell(s)
PBMNL	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PGE_2	Prostaglandin E_2
RANTES	Regulated upon activation normal T-Cell expressed and secreted
rh	rekombinant human
rm	rekombinant Maus
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem cell factor
SCID	Severe combined immunodeficience
TPO	Thrombopoietin

1. EINLEITUNG

1.1. Die Dendritische Zelle

1.1.1. Entwicklung und Funktion der Dendritischen Zelle

Dendritische Zellen sind die potentesten Antigen Präsentierenden Zellen des Immunsystems. Charakterisiert sind sie durch folgende Merkmale:

- unvergleichliche *Sentinelfunktion*, d.h. Antigen wird aufgespürt, aufgenommen und präsentiert
- *Migration* der DC zum Entzündungsherd und anschließend zu den T-Zell-Arealen der lymphatischen Organe
- *Bindung* an antigenspezifische T-Lymphozyten, die DC präsentieren dabei die prozessierten Antigenpeptide
- eine *aktivierende, kostimulierende Funktion* auf T-Lymphozyten, das T-Zell-Wachstum und die Effektorfunktionen der T-Zellen werden induziert (STEINMAN, R., 1991; STEINMAN, INABA, 1999; BANCHEREAU *et. al*., 2000)

Die myeloide DC entwickelt sich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, wobei zwei verschiedene Entwicklungswege beschritten werden können, der CD14-unabhängige und der CD14-abhängige Pfad. Die CD14-unabhängigen DC können *in vitro* aus $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen (aus Knochenmark oder Nabelschnurblut) (CAUX *et al.*, 1992; SANTIAGO-SCHWARZ *et al.*, 1992) gewonnen werden. Ein prototypischer Vertreter stellt hierbei die Langerhanszelle der Haut dar. Die CD14-abhängigen DC hingegen gehen aus $CD14^+$ zur Adhärenz befähigten PBMNL, den peripheren Blutmonozyten, hervor (SANTIAGO-SCHWARZ, 1999). Monozyten können sich in Abhängigkeit der externen Stimuli entweder zu DC oder zu Makrophagen entwickeln. Diese Polarisation kann *in vitro* durch die Zugabe von Cytokinen erreicht werden (SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994). Monozyten, durch GM-CSF und IL-4 kultiviert, besitzen Merkmale unreifer DC wie hohe Endozytoseaktivität, aber schlechte T-Zell-Stimulationsaktivität. Die Zellen sind für die Antigenaufnahme und deren Prozessierung kompetent (ZHOU, TEDDER, 1996). Die so generierten Zellen können durch die Zugabe bestimmter Stimuli, wie TNF-α, IL-1 oder LPS, vollständig ausreifen (SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994, BANCHEREAU *et al*., 2000).

1.1.2. Migration Dendritischer Zellen

Die Wanderung von Leukozyten, inklusive Dendritischer Zellen, zu Entzündungsherden ist abhängig von einer Reihe von Faktoren, den so genannten Chemotaxinen und deren komplementären Rezeptoren auf den Leukozyten. Zu den Chemotaxinen gehören die Anaphylatoxine und die inflammatorischen Chemokine (chemotaktische Cytokine) (BAGGIOLINI, 1997; ALLAVENA *et al*., 2000; ZLOTNIK, YOSHIE, 2000). Die lokale Produktion inflammatorischer Chemokine, z. B. CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES), CCL20 (MIP-3α), ist verantwortlich für die Einwanderung von unreifen DC oder ihren Vorläufern (CYSTER, 1999; SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1999; ALLAVENA *et al*., 2000; McCOLL, 2002), da diese Zellen Rezeptoren für inflammatorische Chemokine wie z. B. RANTES, MIP-1α und MCP-3 exprimieren. In gleicher Weise sind die konstitutiven Chemokine CCL21 (6Ckine) und CCL19 (MIP-3β) für die Migration der DC in die lymphatischen Organe verantwortlich und sind für die Anlockung reifer dendritischer Zellen an den Ort der T-Zell-Stimulation von großer Bedeutung (SOZZANI *et al*., 1998; FÖRSTER *et al*., 1999; GUNN *et al*., 1999). Reife DC haben das Potential große Mengen an IL-12 zu produzieren. Dieses Cytokin bewirkt die Entwicklung einer TH1-Antwort (GATELY *et al*., 1998). Im Gegensatz dazu können IL-10, TGF-β, Corticosteroide, Vitamin D und PGE_2 die DC-Reifung dahingehend beeinflussen, dass sich anstatt einer TH1- eine TH2-Antwort etabliert (BANCHEREAU *et al.*, 2000).

1.1.3. Einfluss von GM-CSF und IL-4 auf die Ausdifferenzierung von myeloiden Dendritischen Zellen

Das von GOUGH *et al.* (1984) isolierte und charakterisierte GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) ist ein Wachstumsfaktor mit breitem Wirkungsspektrum. Es stimuliert *in vitro* die Differenzierung und Proliferation der Vorläuferzellen von Granulozyten, Makrophagen und DC (BURGESS, METCALF, 1980; METCALF *et al*., 1986; INABA *et al*., 1992). GM-CSF wird *in vivo* von Monozyten und auch von Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören, z.B. Fibroblasten, nach Aktivierung durch Entzündungsmediatoren gebildet (KAPLAN *et al.*, 1992; KIRCHNER *et al.*, 1994; BANCHEREAU, STEINMAN, 1998). *In vitro* ist GM-CSF für Überleben, Funktion und immunologische Ausreifung der DC als auch für die Ausbildung DC-typischer Oberflächenmarker z.B. eine starke MHC-Klasse-II Expression, essentiell (WITMER-PACK *et*

al., 1987; HEUFLER *et al.*, 1987; WITMER-PACK *et al.*,1987; ALVARO-GRACIA *et al*. 1989; GERRARD *et al*., 1990; STEINMAN, 1991). Durch GM-CSF können größere Mengen an DC *in vitro* produziert werden. Anhand der Effekte des Cytokins auf die Überlebensfähigkeit, die Funktion und das Wachstum von DC sollte das Cytokin eigentlich GMD-CSF (Granulocyte-macrophage-dendritic cell colony stimulating factor) genannt werden (INABA *et al*., 1992).
Zusammen mit IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 und GM-CSF gehört IL-4 zu den kurzkettigen Vier-Helix-Bündel-Cytokinen. (NICOLA, 1995) Dieses Glykoprotein ist ein Produkt der TH2-Zellen (PAUL, 1991). IL-4 erhöht die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten und verbessert somit deren Antigenpräsentationsfähigkeit (KIRCHNER *et al*., 1994; PAUL, 1991; TE VELDE *et al*., 1988), vergrößert *in vitro* die Anzahl unreifer DC, verringert die Menge an $CD14^+$ Zellen (LAUENER *et al*., 1990; XU *et al*., 1996) und inhibiert die Differenzierung von Makrophagen (JANSEN *et al*., 1989). GERRARD *et al.* haben zeigen können, dass IL-4 einen direkten Effekt auf Monozyten hat (GERRARD *et al*., 1990). *In vitro* wird die APC-Funktion von humanen (ZLOTNIK *et al*., 1987) und von murinen Monozyten (TE VELDE *et al*., 1990) durch die Anwesenheit von IL-4 verbessert.
SALLUSTO und LANZAVECCHIA (1994) konnten in Zusammenfassung dieser Erkenntnisse zeigen, dass adhärente PBMNL, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden, nach dem Einfluss von Reifungsstimuli den Phänotyp und die kostimulierende Aktivität reifer DC ausbildeten.

1.1.4. Überblick über die Rolle von IL-4 im Immunsystem

IL-4 übt seine biologische Funktion über den IL-4-Rezeptor (IL-4R) aus. Es spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Differenzierung von antigenstimulierten naiven T-Zellen (SEDER *et al*., 1992; HSIEH *et al*., 1992). IL-4 unterdrückt sehr wirksam die Generierung von IFN-γ produzierenden TH1-Zellen und kontrolliert die Spezifität des Immunglobulinklassenswitches (GASCAN *et al*., 1991; COFFMAN *et al*., 1986; VITETTA *et al*., 1985). IL-4 besitzt noch andere Effekte im hämatopoetischen Gewebe. Es erhöht die Expression von MHC Klasse II auf B-Lymphozyten (NOELLE *et al*., 1984), stimuliert die Expression des IL-4-Rezeptors (OHARA, PAUL, 1988) und fungiert als Co-Mitogen für das B-Zell-Wachstum (HOWARD *et al*., 1982). Obwohl IL-4 selbst kein Wachstumsfaktor für ruhende Lymphozyten ist, kann es die Lebensdauer von T- und B-Zellen *in vitro* verlängern und Apoptose verhindern (DANCESCU *et al*., 1992; ILLERA *et al*., 1993; ZAMORANO *et al*.,

1996; BOISE *et al*., 1995; MINSHALL *et al*., 1997). Zusätzlich zeigt dieses Cytokin weitreichende und vielfältige Wirkung auf Mastzellen, Makrophagen, hämatopoetische Vorläuferzellen und Stromazellen (JANSEN *et al*., 1989). IL-4 kommt weiterhin eine bedeutende Rolle bei der Zelladhäsion und in Entzündungsreaktionen zu. Es ist beteiligt an der Induktion der Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) auf Gefäßendothel (THORNHILL *et al*., 1991) und blockiert dort die Expression von E-Selektin (BENNETT *et al*., 1997). Diese Änderung in der Balance von Adhäsionsmolekülen während einer Entzündungsreaktion durch IL-4 favorisiert die Rekrutierung von T-Zellen und Eosinophilen gegenüber neutrophilen Granulozyten.

1.1.5. Prostaglandin E_2 in der Immunantwort und sein Einfluss auf Dendritische Zellen

Die Prostaglandine, eine Signalmolekülgruppe, die sich von der Arachidonsäure ableitet, sind Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen und einem Ring aus fünf Kohlenstoffen. PGH_2 ist das Substrat für beide Isoformen der Cyclooxygenase COX-1 und COX-2 und bildet somit das Edukt für die Synthese von PGD_2, PGE_2, $PGF_2\alpha$ und PGI_2. Die Prostaglandine binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren und sind kurzlebige lokale Hormone mit entzündungsstimulierender Wirkung (STRYER, 1995). Während in nicht entzündetem Gewebe die Menge an Prostaglandinen sehr niedrig ist, steigt sie bei inflammatorischen Prozessen rapide an. Sobald die dadurch rekrutierten Immunzellen den Entzündungsherd infiltrieren, wird die Prostaglandinmenge weiter gesteigert. Einige der Enzyme der Prostaglandinsynthese sind induzierbar. Deshalb ist das Synthesemuster während einer Immunantwort abhängig von der Zellart und von deren Aktivierungsstadium.
In inflammatorischen Modellen wurde beobachtet, dass in der frühen Entzündungsphase vor allem PGE_2 gebildet wird (GILROY, 1999). PGE_2 agiert über vier verschiedene Rezeptoren (EP1 bis EP4). Jeder dieser Rezeptoren wird von einem eigenen Gen codiert. Weil die PGE_2-Rezeptoren von verschiedenen Zellen in verschiedenen Mengenverhältnissen exprimiert werden, ist die Wirkung von PGE_2 auf die einzelnen Zellpopulationen sehr unterschiedlich. Jeder PGE_2-Rezeptor vermittelt ein anderes intrazelluläres Signal. Dies ermöglicht der Zelle, eine fein abgestimmte Antwort auf dieses Signal zu geben. Die Expression der verschiedenen PGE_2-Rezeptoren wird unabhängig von einander reguliert. Ein bestimmter Signaltransduktionsweg überwiegt und andere treten in den Hintergrund. Beispielsweise erhöht sich die Menge an EP2 auf Makrophagen nach LPS-Stimulation um das Fünffache, während sich die Menge an EP4 kaum erhöht (TILLEY *et al*., 2001).

PGE_2 übt den gegenteiligen Effekt zu IL-12 auf die TH1 und die TH2 Antwort aus. Beide Mediatoren werden in Monozyten, Makrophagen und DC als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie bakterielle Produkte gebildet (HILKENS *et al*., 1996). Folge dessen wird die TH1/TH2-Balance durch Cytokine und Prostaglandine moduliert. PGE_2 ist hierbei ein TH2-favorisierender Faktor (PALMBLAD, 1990). Es unterdrückt also die zellvermittelte Immunantwort, während es die humorale Antwort begünstigt (ROPER, PHIPPS, 1994; SNIJDEWINT *et al*., 1993). Es moduliert damit APC-Funktionen (HARIZI *et al*., 2001) und die Produktion von inflammatorischen Cytokinen (WILLIAMS, SHACTER, 1997). Studien haben gezeigt, dass PGE_2 ein starker Inhibitor der IL-12 Produktion ist, was wiederum das Vorhandensein eines Feedbackmechanismus auf der Ebene der APC impliziert (VAN der POUW KRAAN *et al*., 1995, STRAUSSMANN *et al*., 1994).

PGE_2 ist ein potenter Induktor für die Produktion von IL-10 (VAN der POUW KRAAN *et al*., 1995, STRAUSSMANN *et al*., 1994, STOLINA *et al*., 2000). IL-10 wird von einer Reihe von Zellen inklusive Monozyten gebildet (GROUX *et al*., 1998) und besitzt einen inhibierenden Effekt auf die TH1-Antwort (MOORE *et al*., 2001; JGIETSEME *et al.*, 2000; FIORENTINO *et al*., 1991). PGE_2 moduliert die DC vermittelte Immunantwort über die Induktion von IL-10 (HARIZI *et al*., 2002).

Die vier PGE_2 Rezeptoren des Menschen (EP1 bis EP4) werden alle von humanen unreifen DC exprimiert, aber nur EP2 und EP4, die über Adenylatcyclase und damit über cAMP ihre Funktion ausüben, werden im Rahmen der DC Aktivität hochreguliert (HARIZI *et al*., 2003). PGE_2 nimmt an der Regulation der Sensitivität von CCR7 teil (CHEN *et al*., 2004, LUFT *et al*., 2002). Deshalb besitzt es eine duale Rolle in der Migration von DC: Die Regulation der Expression und der Empfindlichkeit von CCR7. In Mäusen mit einer EP4-Defizienz zeigen die DC eine stark eingeschränkte Wanderungsfähigkeit in Richtung Lymphknoten (KABASHIMA *et al*., 2003).

Genau wie TNF-α, IL-1β und IL-6 ist PGE_2 an der Reifung von humanen MoDC beteilgt (JONULEIT *et al*., 1997, KALINSKI *et al*., 1997). Obwohl selbst als proinflammatorischer Mediator determiniert, hemmt PGE_2 die Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen (TNF-α, IL-6, IL-12) (KALINSKI *et al*., 1997; JOZEFOWSKI *et al*., 2003; VASSILIOU *et al*., 2003) und von proinflammatorischen Chemokinen wie CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β) und CXCL10 (IP-10) (JING *et al*., 2003; KURODA *et al*., 2001) in LPS-stimulierten humanen MoDC und murinen KMDC. Die Bedeutung von PGE_2 wird deutlich in EP4-defizienten Mäuse, die eine schwere Colitis entwickeln (NARUMIYA *et al*., 1999). Weiterhin werden beim Menschen durch die Einnahme nichtsteroider antiinflammatorischer Substanzen, die als

COX-Hemmer fungieren, entzündliche Erkrankungen der Harnblase begünstigt (AABAKKEN *et al*., 1989). Diese Studien zeigen eine antiinflammatorische Rolle des PGE_2 übereinstimmend mit früheren Beobachtungen des antiproliferativen Einflusses von PGE_2 auf aktivierte T-Zellen (TILLEY *et al*., 2001).

1.2. Rezeptoren

1.2.1. Cytokinrezeptoren

1.2.1.1. Der IL-4-Rezeptor: Signalgebung und biologische Funktionen

1.2.1.1.1. Die Struktur des IL-4-Rezeptors

Der IL-4-Rezeptor ist Mitglied der Hämatopoetinrezeptorsuperfamilie und ein pleiotroper Typ I Cytokinrezeptor, der von TH2-Zellen, Basophilen und Mastzellen exprimiert wird. IL-4 wird von bestimmten Subtypen der T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen produziert und ebenfalls von γ/δ T-Zellen und Eosinophilen. Der IL-4-Rezeptor findet sich außerdem in hämatopoetischem, endothelialem, epithelialem Gewebe sowie auf Muskelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten und Hirnzellen. Der Rezeptor besteht aus einer 140 kDa IL-4Rα-Kette, die IL-4 mit hoher Affinität bindet. Obwohl die künstliche Homodimerisierung der IL-4Rα-Kette in der Auslösung eines Signals mündet, spielt physiologisch nur die Heterodimerisierung mit einer zweiten Kette eine Rolle. Die allgemeine γ-Kette (γc-Kette), zuerst beim IL-2-Rezeptor entdeckt, ist der vorrangige Bindungspartner in vielen Geweben. Die γc-Kette erkennt dabei einen Komplex aus IL-4 und IL-4Rα. Obwohl die γc-Kette die Affinität des IL-4 Rezeptors für IL-4 nur wenig erhöht, wird sie für die Aktivierung der Signaltransduktion benötigt (NELMS *et al*., 1999).

Mitglieder der Hämatopoetinrezeptorsuperfamilie teilen Strukturmotive in der extrazellulären Region. Diese besteht aus Typ III Fibronektindomänen, die konservierte gepaarte Cysteinreste und in der Membranproximalregion ein WSXWS-Motiv aufweisen, welches für die Cytokinbindung benötigt wird (MIYAJIMA *et. al*., 1992; LIVNAH *et al*., 1996). Strukturelle Abweichungen in der extrazellulären Domäne der IL-4Rα-Kette führen zu verändertem Rezeptorsignalverhalten. In der Tat weist eine Variante der IL-4Rα-Kette mit einer Ile50Val Substitution bei atopischen Patienten eine gesteigerte Signaltransduktion auf, die wiederum in einer erhöhten IgE-Produktion mündet (MITSUYASU *et al*., 1998).

In der cytoplasmatischen Domäne der IL-4Rα-Kette gibt es fünf Tyrosinreste, deren Positionen und umgebenden Sequenzen stark konserviert sind und bei verschiedenen Spezies vorkommen, was wiederum den Schluss zulässt, dass diese Bereiche funktionell bedeutsam sind (siehe Abb. 1, NELMS *et al*., 1999). Eine kleine prolinreiche Sequenz in der membrannahen Region der Kette, genannt Box-1-Motiv, ist in einer Reihe von Hämatopoetinrezeptoren zu finden. Die daran angrenzende saure Region und das Box-1-Motiv selbst sind ähnlich denen in der IL-2Rβ-Kette, welche mit Kinasen der Src-Familie interagiert (MURAKAMI *et al*., 1991; MINAMI *et al*., 1993).

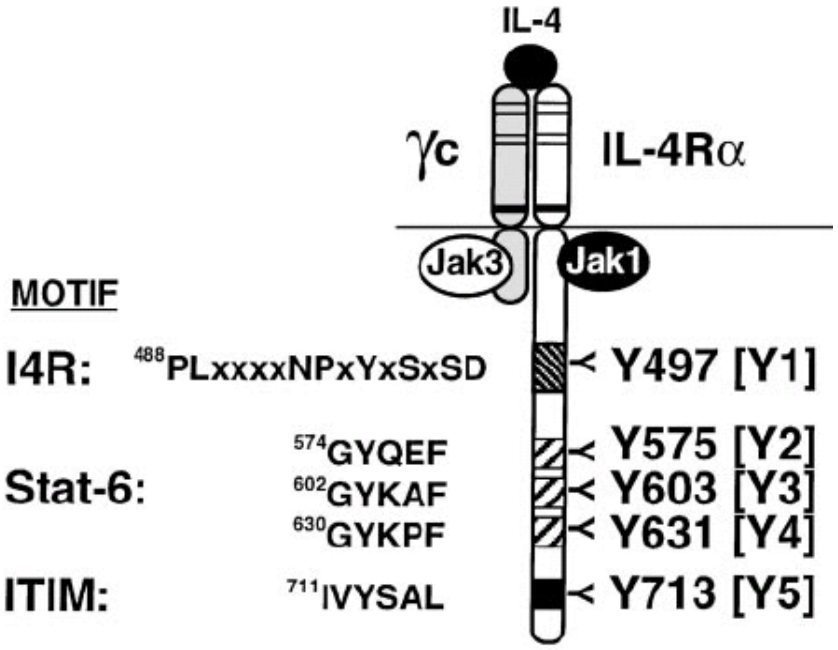


Abb. 1: IL-4R Struktur und Funktion. Der IL-4R-Komplex besteht aus der IL-4Rα-Kette und der γc-Kette. Diese sind mit den Tyrosinkinasen Jak1 und Jak3 assoziiert. Die cytoplasmatische Domäne der humanen IL-4Rα-Kette enthält fünf konservierte Tyrosinreste. Das der Cytoplasmamembran am nächsten liegende (Y497) ist Teil des I4R-Motivs, welches für die Interaktion mit IRS-1/2 und damit für die Ausbildung von Proliferationssignalen und Antiapoptosesignalen wichtig ist. Die Tyrosinreste zwei, drei und vier (Y575, Y603 und Y631) sind eingebettet in stark konservierte Sequenzen, die für die Bindung und Aktivierung von STAT6 unabdingbar sind. Das C-terminale Tyrosin (Y713) dient als Bindestelle für regulierende Phosphatasen wie SHIP (NELMS *et al*., 1999).

1.2.1.1.2. Aktivierung der Signaltransduktion durch den IL-4-Rezeptor

Die ligandeninduzierte Dimerisierung oder Multimerisierung von Cytokinrezeptoren mündet in der Aktivierung von Tyrosinkinasen, die zelluläre Substrate phosphorylieren und damit Signalkaskaden initiieren (MIYAJIMA *et. al*., 1992). Die Bindung von IL-4 an seinen Rezeptorkomplex führt zur intrazellulären Tyrosinphosphorylierung an der IL-4Rα-Kette. Weder die IL-4Rα-Kette noch die γc-Kette besitzen eine endogene Kinaseaktivität, sind also keine Rezeptortyrosinkinasen. Der IL-4R und alle anderen Mitglieder der Hämatopoetinrezeptorfamilie benötigen rezeptorassoziierte Kinasen für die Initiierung der Signaltransduktion. Cytoplasmatische Proteintyrosinkinasen wie Src und Jak sind mit Typ I Cytokinrezeptoren wie dem IL-4R assoziiert. Die Familie der Janustyrosinkinasen (Jak) ist hierbei von großer Wichtigkeit (TANIGUCHI, 1995).

Drei Mitglieder der Familie der Januskinasen, nämlich Jak1, Jak2 und Jak3, werden IL-4R abhängig aktiviert und sind verbunden mit Komponenten des IL-4R-Komplexes (RANE, REDDY, 2000). In den meisten hämatopoetischen Zellen erfolgt nach IL-4-Stimulation die Phosphorylierung von Jak1 und Jak3 (WITTHUHN, *et al*., 1994; YIN *et al*., 1994). Jak1 assoziiert mit IL-4Rα (YIN *et al*., 1994), während Jak3 mit der γc-Kette interagiert (MIYAZAKI *et al*., 1994). Die Bindung von IL-4 an die IL-4Rα-Kette mündet in der Tyrosinphosphorylierung von Jak1 und Jak3. In nichthämatopoetischen Zellen erfolgt eine IL-4 bedingte Phosphorylierung von Jak1, Jak2 und Tyk2, nicht aber von Jak3. Für die Interaktion von Jak1 mit der IL-4Rα-Kette scheinen das Box-1-Motiv und die saure Region verantwortlich zu sein. Jak1 ist hierbei für die IL-4 stimulierte Induktion der IRS-1/2 Phosphorylierung absolut unverzichtbar (WANG *et al*., 1997; CHEN *et al*., 1997).

Die Aktivierung der IL-4R assoziierten Kinasen führt zur Tyrosinphosphorylierung der IL-4Rα-Kette, ein Prozess, der sehr schnell nach der Ligandenbindung stattfindet. Die fünf konservierten Tyrosinreste der cytoplasmatischen Domäne der IL-4Rα-Kette sind potentielle Phosphorylierungsstellen und damit involviert in die Interaktion mit Signalproteinen, die SH2 (Src-homology 2) oder PTB (phosphotyrosinbindende) Domänen aufweisen.

Die cytoplasmatische Domäne von IL-4Rα enthält drei funktionell verschiedene Regionen, eine für die Interaktion mit Jak1, eine zweite für die Aktivierung von Proliferation und Apoptosehemmung und die dritte für die Initiierung von Signalen, die über die Aktivierung von STAT6 zur Induktion IL-4 abhängiger Gene führen (NELMS *et al*., 1999).

1.2.1.1.3. Der IRS-1/2-Signalweg

Bei der IL-4-induzierten Signaltransduktion spielt neben dem STAT6 ein weiteres Signalmoleküle, welches in Folge der Ligation des IL-4R phosphoryliert wird, eine wichtige Rolle. Es handelt sich hierbei um das 170 kDa Phosphoprotein 4PS/IRS-2 (IL-4 induced phosphotyrosine substrate/insulin receptor substrate 2) (siehe Abb. 2). Seine Funktion liegt in der Aktivierung einer Klasse I PI3K, die verschiedene Proteinkinasen reguliert. Das Signalmolekül 4PS ist mit dem IRS-1 (Insulinrezeptorsubstrat-1) verwandt. Die Gene für 4PS und IRS-1 weisen einen hohen Grad an Übereinstimmung auf, so dass 4PS in IRS-2 umbenannt wurde (SUN *et al*., 1995).

Die Bedeutung von 4PS/IRS-2 als IL-4-abhängiges Molekül wurde an der myeloiden Vorläuferzelllinie 32D demonstriert. Diese Zellen exprimieren keine nachweisbaren Mengen an IRS-Molekülen (WANG *et al*., 1993; SUN *et al*., 1995). Während andere myeloide Linien, die IRS-2 bilden und nach IL-4-Stimulation proliferieren, tun 32D Zellen dies nicht. 32D Transfektanten, die IRS-2 exprimieren, zeigen nach IL-4-Stimulation eine Zellvermehrung. Dies lässt den Schluss zu, dass IRS-1/2 eine Verbindung zwischen IL-4R und den Signalwegen herstellt, die in der Induktion zellulärer Proliferation involviert sind.

Die Region zwischen den Resten 437 und 557 mit der darin eingebetteten Aminosäuresequenz ^{488}PLXXXXNPX**Y**XSXSD (siehe Abb. 1) der IL-4Rα-Kette ist für die Aktivierung von IRS-1/2 und der damit verbundenen IL-4-induzierten Aktivierung der Proliferation verantwortlich. Sie enthält ein stark konserviertes Tyrosin. Die Sequenz besitzt eine große Homologie zu Sequenzen der cytoplasmatischen Domäne des Insulinrezeptors und des Rezeptors für IGF-1, die ebenfalls mit dem IRS-1/2-Signalweg interagiert. Die Substitution des Tyrosins durch Phenylalanin blockiert den IRS-1/2-Signalweg, da in der IL-4Rα-Kette an der Position 497 nun keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann (KEEGAN *et al*., 1994). Da diese Sequenz sowohl für Funktionalität des Insulinrezeptor als auch für die des IL-4Rα bedeutsam ist, wird sie I4R-Motiv (Insulin IL-4 Rezeptor Motiv) genannt. IRS-1/2 Moleküle binden an das phosphorylierte Y497 mittels einer N-terminale PTB-Domäne an (GUSTAFSON *et al*., 1995). Weiterhin sind die Reste L489, P488 und I491 im I4R-Motiv der IL-4Rα-Kette für die Interaktion mit IRS-2 notwendig (WANG *et al*., 1998).

Der N-Terminus von IRS-1/2 enthält eine PH-Domäne (Pleckstrinhomologiedomäne) wie sie in einer Vielzahl von Signalmolekülen vorhanden ist (ZHOU *et al*., 1995). PH-Domänen scheinen eine Rolle in der Lokalisierung von Proteinen an der Plasmamembran zu spielen, da sie direkt mit Phosphatidylinositolmembranlipiden interagieren können (LEMMON *et al*.,

1995). IRS-1/2 werden phosphoryliert als Resultat der Interaktion mit dem aktivierten IL-4R. Eine Reihe der phosphorylierten Stellen interagiert direkt mit SH2-Domänen verschiedener Signalmoleküle, z.B. der SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit von PI3K. Dies verdeutlicht die Bedeutung von IRS-1/2 als cytosolische Brückenproteine (SUN *et al*., 1991; SUN *et al*., 1993; SUN *et al*., 1995).

Die primäre PI3K-Isoform, die durch IL-4 aktiviert werden kann, ist eine Klasse IA PI3K (siehe Abb. 5) bestehend aus der regulatorischen Untereinheit p85 und der katlytischen Untereinheit p110. Die p85 Untereinheit enthält zwei SH2-Domänen im C-Terminus und eine SH3-Domäne im N-Terminus (KAPELLER *et al*., 1994A; KAPELLER *et al.*, 1994B). Die SH2-Domänen von p85 flankieren eine 104 AS-Sequenz, welche die Interaktion mit p110 ermöglicht (KLIPPEL *et al*., 1993, DHAND *et al*., 1994). Die p85 Untereinheit agiert als Adaptermolekül, indem es p110 mit tyrosinphosphorylierten Molekülen verbindet (FRUMAN, CANTLEY, 2002). Die IL-4R-Stimulation führt zur Bindung von p85 an phosphoryliertes IRS-1/2 Moleküle. IRS-1 hat vier, IRS-2 zehn potentielle p85 Bindestellen (SUN *et al*., 1995; SUN *et al*., 1993).

Die Interaktion von p85 mit IRS-1/2 mündet in einer Konformationsänderung der mit ihr fest verbundenen p110 Untereinheit und führt damit zur Aktivierung ihrer katalytischen Eigenschaften (DHAND *et. al*., 1994). Durch die Lipidkinaseaktivität der PI3K wird *in vitro* die Hydroxylgruppe am dritten C-Atom des Inositolringes von Phosphatidylinositolen der Zellmembran phosphoryliert (FRUMAN, CANTLEY, 2002). Die schnelle Produktion von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat und Phosphatidylinositol-(3,4)-dipahosphat gewährleistet die Aktivierung von zahlreichen Kinasen wie Proteinkinase C und die Akt Kinase (Proteinkinase B) (FRANKE *et al*., 1997B; FRUMAN, CANTLEY, 2002). Einmal aktiviert, phosphoryliert p110 auch Serin- und Threoninreste von Proteinen (DHAND *et. al*., 1994), besitzt also neben der Lipidkinaseaktivität auch Proteinkinaseaktivität. PI3K phosphoryliert Ser/Thr an IRS-1. Es ist durchaus möglich, dass eine Phosphorylierung von IRS-1/2 an Ser/Thr die Interaktion mit dem I4R-Motiv von IL-4Rα verringert oder gar blockiert, so dass eine weitere IRS-1/2-Aktivierung verhindert wird. Dies würde als negatives Feedback der Regulierung des IRS-1/2-Signalweges dienen (PAZ *et al*., 1997).

Die Aktivierung des IRS-1/2-Signalweges ist unter Umständen verbunden mit der Aktivierung des Ras/MAPK-Weges in einer Reihe von Cytokinrezeptorstimulationen und Insulin. Die IL-4-bedingte Aktivierung des Ras/MAPK-Weges konnte in hämatopoetischen Zellen nicht durchgängig nachgewiesen werden (DURONIO *et al*., 1992; WELHAM *et al*.,

1994A; WELHAM *et al*., 1994B; WELHAM *et al*., 1995). Dies könnte ganz speziell von der untersuchten Zelllinie und dem Entwicklungsstadium der Zellen abhängen.

1.2.1.1.4. Die Aktivierung von STAT6

Während das I4R-Motiv von IL-4Rα bedeutsam ist für die Aktivierung von Signalwegen, welche die Zellproliferation regulieren, sind andere Regionen des cytoplasmatischen Teils der IL-4Rα-Kette für die Aktivierung von IL-4-induzierter Genexpression zuständig. Dies betrifft die Genregulierungsdomäne zwischen den Aminosäureresten 557 bis 657 (RYAN *et al*., 1996). Sie enthält drei konservierte Tyrosinreste (Y575, Y603, Y631) als potentielle Phosphorylierungsstellen und Interaktionsareale für SH2-Domänen von Signalproteinen. Die Mutation aller drei Tyrosinreste führt zu einer stark verminderten IL-4-induzierten Genexpression. Die Genregulierungsdomäne benötigt wenigstens ein intaktes Tyrosin, um seiner Funktion gerecht zu werden. Die Reste, welche die Tyrosine der Genregulationsdomäne unmittelbar umgeben, sind GYK/QXF (Y575 in GYQEF, Y603 in GYKAF, Y631 in GYKPF, siehe Abb. 1). Sie stellen den Anbindungsbereich für die STAT6-Moleküle dar. Das zentrale Tyrosin des I4R-Motivs ist eingebettet in die Sequenz AYRSF. Durch seine Ähnlichkeit mit den tyrosinhaltigen Sequenzen der Genregulationsdomäne kann auch das I4R-Motiv als schwache Bindestelle für STAT6 fungieren (NELMS *et al*., 1999).

Die Entdeckung der STAT-Moleküle (Signal transducers and activators of transcription) enträtselte den Mechanismus der cytokinabhängigen Expression für IL-4 und für andere Cytokine. Ein oder mehrere STAT-Moleküle werden von jedem Mitglied der Hämatopoetinrezeptorfamilie und von den mit ihnen verwandten Rezeptoren aktiviert. STATs dienen der direkten Verbindung zwischen dem Cytokinrezeptor und dem Transkriptionsapparat. Die Phosphorylierung durch Jak ist für die STAT-Aktivierung essentiell. Deshalb wird diese Art der Signaltransduktion auch Jak-STAT-Weg genannt (DARNELL, 1997).

STAT6 wird durch IL-4-Stimulation aktiviert und ist essentiell für die Expression vieler IL-4-abhängiger Gene oder verbessert zumindest deren Expression, z.B. VCAM-1, Eotaxin, MCP-1, MCP-3, MHC Klasse II, CD23, IgE, IgG1, IL-4Rα (KAPLAN *et al*., 1996; MALERBA, PIGNATTI, 2005; RYAN *et al*., 1996; NAKANISHI *et al*., 1996). STAT6 bindet am phosphorylierten Rezeptor (Y575, Y603, Y631) über seine stark konservierte SH2-Domäne. Dies führt zur Phosphorylierung von STAT6 an einem C-terminalen Tyrosinrest (DARNELL,

1997). STAT6 dissoziiert vom Rezeptor und bildet Homodimere über die SH2-Domänen und den phosphorylierten C-terminalen Tyrosinresten. Diese Komplexe wandern zum Kern wo sie an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion von IL-4-abhängigen Genen binden. STAT-Moleküle erkennen palindrome Sequenzen. Diese variieren in Abhängigkeit des zu bindenden STAT, weisen aber meistens das Grundmuster $TTC(N)_nGAA$ auf. Jedes Monomer eines STAT-Komplexes assoziiert mit einer Hälfte des Palindroms (CHATTERJEE-KISHORE *et al*., 2000). STAT6 bindet vorrangig an die Sequenz $TTC(N)_4GAA$ (EHRET, *et al*., 2001; SEIDEL, *et al*., 1995).

Es ist bekannt, dass STATs mit Transkriptionsfaktoren stabile Komplexe bilden. Dies konnte für STAT6 und NF-κB mittels Coimmunpräzipitation nachgewiesen werden (SHEN, STAVNEZER, 1998). Die Kooperation mit NF-κB ist wichtig für die Transkriptionsaktivierung des IgE-Gens durch STAT6 (MIKITA *et al*., 1996; SHEN, STAVNEZER, 1998).

Die Bedeutung von STAT6 wurde in verschiedenen Studien an knockout Mäusen demonstriert. STAT6-knockout Mäuse zeigen keine nachweisbare Menge an IgE. Sie reagieren auf die Infektion mit dem Helminthen *Nippostrongylus brasiliensis* oder auf die Injektion von anti-IgD mit einem sehr geringen Anstieg von IgE (ca. 1% des IgE-Wertes des Wildtyp). STAT6-knockout Mäuse sind nicht in der Lage, eine TH2-Antwort gegen *Nippostrongylus brasiliensis* zu initiieren. Sie können den Parasiten dadurch nicht erfolgreich abwehren. Lymphozyten von STAT6-knockout Mäusen können keinen Klassenswitch zu IgE und IgG1 nach Stimulation durch LPS und IL-4 durchführen. Diese Tiere zeigen keine IL-4-induzierte Genexpression, wie die Hochregulierung von CD23, MHC Klasse II und IL-4R. Nach IL-4-Gabe erfolgt keine Unterdrückung der Differenzierung von naiven T-Zellen in IFNγ-produzierende TH1-Zellen. Diese spezifische Immundefizienz von STAT6-/- Mäusen stammt von der Blockade der IL-4-abhängigen TH2-Zellentwicklung und von der Unfähigkeit einen Klassenswitch in B-Zellen zu initiieren, weil IL-4 nicht gebildet wird und weil STAT6-/- Zellen unempfänglich für die IL-4-Stimulation sind (NAKANISHI *et al*., 1996; URBAN *et al*., 1998). Die Symptomatik, welche von STAT6-knockout Mäusen gezeigt wird, ist die gleiche wie die von IL-4Rα-knockout Mäusen (NOBEN-TRAUTH *et al*., 1997). Analysen von STAT6-defizienten Mäusen zeigen, dass IL-4 als Co-Mitogen für B- und T-Zellen trotzdem wirksam ist. IL-4 schützt auch hier B- und T-Lymphozyten vor spontaner Apoptose (VELLA *et al*., 1998).

Ein Polymorphismus in der Kernsequenz der STAT6-Bindestelle um das Tyrosin 575 der IL-4Rα-Kette (Q576R) wurde bei Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom und bei Patienten mit atopischer Dermatitis gefunden. Dieser Polymorphismus geht mit einer gesteigerten

Expression von CD23 und verstärkter IgE-Produktion einher. Der Austausch von Q nach R scheint die Bindungsfähigkeit für STAT6 zu verbessern (HERSHEY *et al*., 1997).

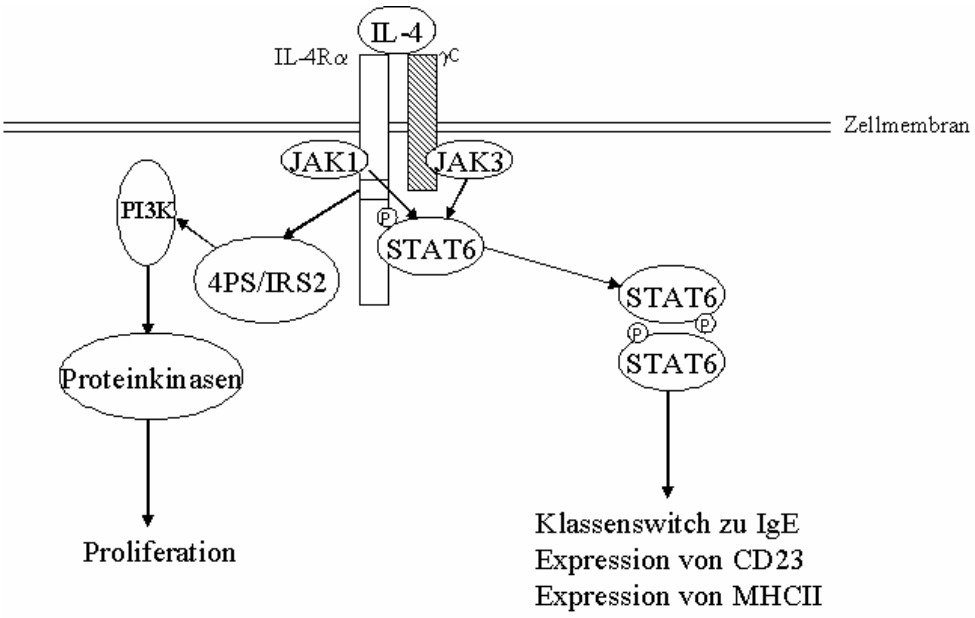


Abb. 2: Schema der IL-4-Signaltransduktionskaskade im Typ I IL-4R in hämatopoetischen Zellen (TAKEDA *et al*., 1997; CHATILA, T. A., 2004).

1.2.1.1.5. Modulation der IL-4-Rezeptor-Signalwege

1.2.1.1.5.1. Die Rolle von Phospho-Tyrosin-Phosphatasen

Die Tyrosinphosphorylierung und Interaktion von Signalproteinen repräsentiert den Beginn vieler Signalwege. Die allgemeine Kontrolle von Tyrosinphosphorylierungen obliegt den Phospho-Tyrosin-Phosphatasen (PTP). Die SH2-enthaltenden Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 als auch die SH2-enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP) sind wichtige Modulatoren in Cytokinsignalwegen (SCHARENBERG, KINET, 1996).

SHP-1/2 interagieren über ihre SH2-Domäne mit so genannten ITIMs (immunregulatory tyrosine based inhibitory motif). Während SHP-2 in vielen Geweben exprimiert wird, kommt SHP-1 vorrangig in hämatopoetischem Gewebe vor und ist dort unabdingbar für die Regulation von cytokininduzierten Signalwegen (DAVID *et al*., 1995). Eine ITIM-Region ist am C-Terminus der IL-4Rα-Kette zu finden. Es ist daher wahrscheinlich, dass SHP-1/2 über diese Region eine regulierende Funktion auf die Phosphorylierungsreaktionen, die in Assoziation mit dem IL-4R stattfinden, ausübt. HAQUE *et. al*. wiesen nach, dass eine spezifische Hemmung dieser Phosphataseaktivitäten zu einer Jak1 und STAT6-Aktivierung

führt. Damit wäre die Regulationsfunktion von SHP-1/2 belegt (HAQUE *et al*., 1998). Laut DAVID *et al*. wirkt SHP-1 auf Jak1 ein und ist deshalb sein direkter Regulator (DAVID *et al*., 1995). KASHIWADA *et al*. zeigten, dass Zellen mit einer Mutation in Position 713 von IL-4Rα gleiche Level an Jak1 und phosphoryliertem IRS-2 aufweisen wie diejenigen, die keine Mutation an Tyrosin 713 trugen, was wiederum vermuten lässt, dass frühe Prozesse in der Signaltransduktion des IL-4R durch die Funktionen des ITIM nicht beeinflusst werden (KASHIWADA *et al.*, 2001). Dies würde den Ergebnissen von DAVID *et al.* und HAQUE *et. al.*, welche eine Beeinflussung der Jak1 Aktionen beobachteten, widersprechen. Das ITIM der IL-4Rα-Kette scheint vielmehr Teil eines gezielten Regulationsmechanismus für STAT6 zu sein. Die Mutation Y713F im ITIM bewirkt eine signifikante Erhöhung der STAT6-Phosphorylierung, was wiederum eine höhere Bindungsaktivität der STAT6-Moleküle untereinander und damit eine stärkere Aktivierung des IL-4Rα-abhängigen Jak-STAT-Weges zur Folge hat (KASHIWADA *et al.*, 2001).
Im Gegensatz zu SHP-1/2, die auf Phosphoproteine Einfluss nehmen, agiert SHIP mit dem 5´Phosphat von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat und reguliert somit den PI3K-Weg durch Dephosphorylierung der PI3K-Produkte (SCHARENBERG, KINET, 1996). Diese Phosphataseaktivität mündet nicht zwangsläufig in eine negative Regulation des PI3K-Weges. Die Bildung von Phosphatidyinositol-(3,4)-diphosphat ist ein wichtiger Aktivator der antiapoptotischen Kinase Akt (FRANKE *et al*., 1997).

1.2.1.1.5.2. Negative Regulation des Jak-STAT-Weges

Ein zweiter regulatorischer Mechanismus spielt eine spezifische Rolle in der Modulation des Jak-STAT-Weges. Es handelt sich hierbei um eine Reihe von Proteinen mit SH2-Domänen, deren Expression durch die cytokinstimulierte STAT-Aktivierung induziert wird: CIS (cytokin induzierte SH2), SOCS-1, 2, 3 (Suppressoren der Cytokinsignale), JAB (Jak bindend), SSI-1 (STAT induzierter STAT Inhibitor). Sie werden innerhalb einer Stunde nach Cytokinstimulation gebildet. Die Mengen dieser Regulatoren sind cytokinabhängig. IL-4 erhöht die Expression von CIS und SOCS-3 vor allem in Knochenmarkzellen, stimuliert ebenso die Bildung von SOCS-1 und SOCS-2, aber in geringerem Umfang. Diese Regulationsproteine scheinen direkt mit aktivierten Januskinasen zu interagieren und sie dadurch zu hemmen. (STARR *et al*, 1997, NAKATA *et al*., 1997, ENDO *et al*., 1997).

1.2.1.2. Der IL-13-Rezeptor

IL-13 wird von aktivierten T-Zellen sezerniert und ist mit IL-4 verwandt. Beide Cytokine liegen auf dem humanen Chromosom 5 und bei der Maus auf Chromosom 11. Das Protein IL-13 zeigt eine große Homologie zu IL-4. Biologisch teilen beide Cytokine viele Funktionen miteinander wie z.B. die Expressionssteigerung von MHC Klasse II auf B-Zellen und Makrophagen und den Klassenswitch zu IgE. Aber IL-13 ist nicht in der Lage, eine T-Zell-Polarisierung zu bewirken. Die Übereinstimmungen in den biologischen Funktionen von IL-4 und IL-13 lassen sich durch die Ähnlichkeit der Rezeptoren für diese Cytokine erklären. Ein Beweis hierfür ist die Tatsache, dass ein monoklonaler Antikörper gegen die α-Kette des IL-4R auch die durch IL-13 induzierten Aktionen hemmt. IL-13 kann sowohl die α-Kette des IL-4-Rezeptors als auch die des IL-13-Rezeptors nutzen, ebenso wie IL-4 den IL-4Rα/γc oder den IL-4Rα/IL-13Rα (siehe Abb. 3, TAKEDA *et. al*., 1997). Dies erklärt, warum eine Reihe von Zellen, die nicht die γc-Kette exprimieren, trotzdem für IL-4 sensitiv sind (OBIRI *et al.*, 1995; DAWSON *et al.*, 1997). Die IL-13Rα-Kette, die von diesen Zelllinien exprimiert wird, bildet zusammen mit IL-4Rα einen IL-4-bindenden Rezeptorkomplex. In der Tat ist IL-13Rα der Assoziationspartner von IL-4Rα in nichthämatopoetischem Gewebe (MURATA *et al*., 1998). Demzufolge spielt STAT6 nicht nur in der IL-4-Signaltransduktion eine entscheidende Rolle sondern auch in der von IL-13. Alle IL-13-bedingten Funktionen finden in STAT6-defizienten Mäusen nicht statt (KAPLAN *et. al.*, 1996; TAKEDA *et al*., 1999).

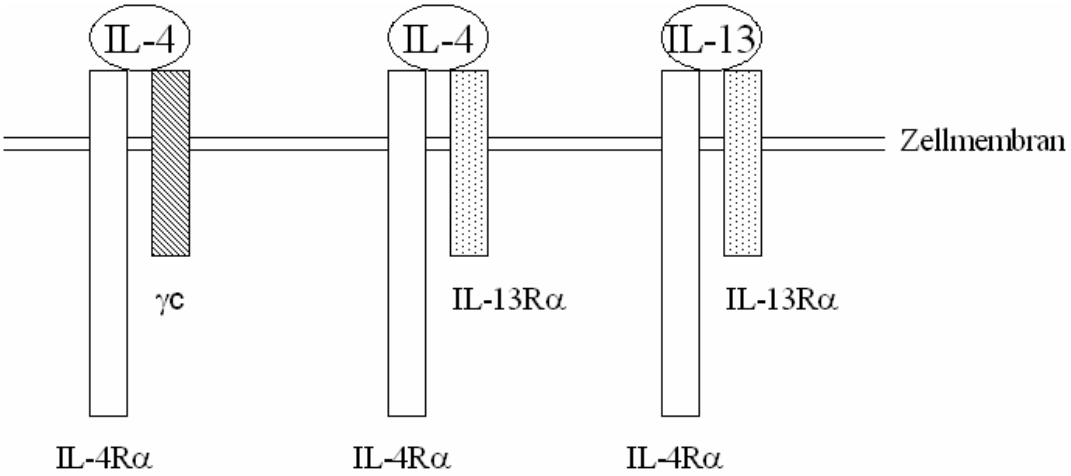


Abb. 3: Modell des IL-4- und des IL-13-Rezeptorkomplexes. IL-4 bindet den Komplex aus IL-4Rα und γc (Typ I IL-4R) als auch den aus IL-4Rα und IL-13Rα (Typ II IL-4R). IL-13 bindet den Komplex aus IL-4Rα und IL-13Rα (TAKEDA *et al*., 1997).

IL-4Rα ist essentiell für die Signaltransduktion beider Cytokine. Durch die Paarung von IL-4Rα mit definierten Partnerketten und der daraus resultierenden Bildung verschiedener Rezeptorheterodimerkomplexe wird nach Bindung eines entsprechenden Liganden die jeweilige spezifische Signaltransduktion in Gang gesetzt. Man unterscheidet je nach Partnerkette den Typ I IL-4R vom Typ II IL-4R. Typ I IL-4R besteht aus IL-4Rα und der γc-Kette, die auch als Bestandteil anderer Cytokinrezeptoren auftritt, z.B. bei IL-2R, IL-7R, IL-9R und IL-15R, und deshalb als common gamma Untereinheit bezeichnet wir. Typ I IL-4R kommt auf hämatopoetischen Zellen vor und ist hochspezifisch für IL-4. Beim Typ II IL-4R bindet IL-4Rα die Partnerkette IL-13Rα1. Diesen Rezeptor findet man auf hämatopoetischen als auch bei nichthämatopoetischen Zellen wie dem Epithel der Atemwege. Typ II IL-4R bindet nicht nur IL-4 sondern auch IL-13. IL-13 interagiert zuerst mit IL-13Rα1, welches nur eine geringe Affinität für IL-13 besitzt. Danach wird die IL-4Rα-Kette gebunden, und die Affinität für IL-13 erhöht sich um ein Vielfaches (AMAN *et al*., 1996). Für IL-13 existiert noch ein weiterer Rezeptor mit hoher Spezifität aber ohne erkennbare biologische Funktion im Sinne einer Signalübertragung. Dieser einkettige Rezeptor besteht nur aus der IL-13Rα2-Kette und scheint dem Abfangen überschüssigen IL-13 zu dienen. Diese Funktion könnte als Regulation der IL-13-Wirkung angesehen werden und würde somit der Vorbeugung einer allergischen Reaktion dienen. Viele Studien offenbaren tatsächlich die Dominanz von IL-13 gegenüber IL-4 beim Induzieren von Merkmalen allergischer Atemwegserkrankungen, wie z.B. Becherzellmetaplasie, Schleimüberproduktion, Gewebseosinophilie und Ventilationstörung. Somit wäre eine entsprechende Inhibition der IL-13-Wirkung durch die IL-13Rα2-Kette denkbar (CHATILA, 2004).

1.2.2. Sieben-Helix-Rezeptoren (Serpentin-Rezeptoren)

1.2.2.1. Charakteristika

Bei unreifen DC findet man Rezeptoren für inflammatorische Mediatoren, bei reifen DC Rezeptoren für das Homing in lymphatische Organe und für die Bindung an T-Lymphozyten. Anders gesagt exprimieren DC während ihrer Reifung wechselnde Muster von stadienspezifischen Oberflächenmolekülen. Hierzu gehören die so genannten Sieben-Helix-Rezeptoren. Diese spielen zusammen mit den an sie gekoppelten G-Proteinen eine zentrale Rolle bei vielen Signaltransduktionen aller Eukaryonten und besitzen eine lange Evolutionsgeschichte. Aufgrund ihres phylogenetischen gemeinsamen Ursprungs sind

Serpentin-Rezeptoren durch gemeinsame Grundprinzipien gekennzeichnet:

- Sieben-Helix-Rezeptoren entfalten ihre Wirkung immer über G-Proteine. G-Proteine sind auch immer an Sieben-Helix-rezeptoren gekoppelt.
- Sieben-Helix-Rezeptoren haben eine zentral gelegene Ligandenbindestelle in der Höhe der Lipiddoppelschicht.
- Die Ligandenbindung löst eine Konformationsänderung aus, die durch die intrazellulären Loops des Rezeptors weitergeleitet werden. Hierbei ist vor allem die dritte cytosolische Schleife von zentraler Bedeutung für die Signalübertragung auf die entsprechenden G-Proteine.
- Werden Sieben-Helix-Rezeptoren durch einen Liganden aktiviert, kommt es zum Austausch von GTP gegen GDP unter Beteiligung der assoziierten G-Proteine.
- Die Bindung von GTP an ein G-Protein löst dessen Aktivierung aus und es dissoziiert in die Untereinheiten G_α und $G_{\beta\gamma}$. Dadurch wird der aktivierte Rezeptor freigegeben. Das Signal wird fast immer durch die G_α-Unterinheit weitergeleitet, manchmal auch durch $G_{\beta\gamma}$.
- Aktivierte Sieben-Helix-Rezeptoren werden durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in ihrem Carboxyterminus deaktiviert.
- G_α hydrolysiert das gebundene GTP zu GDP und überführt das G-Protein wieder in die inaktive Form, wodurch dessen Dissoziation aufgehoben werden kann und die Bindung an die cytosolische Seite des Serpentin-Rezeptors erneut möglich wird.
- Viele G-Proteine sind gegenüber dem Choleratoxin und dem Pertussistoxin sensitiv und können durch diese unkontrolliert aktivert bzw. inaktivert werden. Das Choleratoxin stabilisiert die Bindung von GTP am G-Protein (Aktivierung), das Petussistoxin die Bindung von GDP (Inaktivierung) (STRYER, 1995).

G-Protein-basierende Signalwege induziert über Serpentinrezeptoren aktivieren den einzigen Vertreter der Klasse IB PI3K, die PI3Kγ (Abb.5). Deren katalytische Untereinheit ist die p110γ. Nur sie assoziiert mit der regulatorischen Untereinheit p101, die wiederum spezifisch an das βγ-Dimer des aktivierten G-Proteins bindet und dadurch die PI3Kγ stimuliert. Die mit der βγ-Untereinheit von G-Proteinen-assoziierende PI3Kγ produziert vor allem Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat und aktiviert anschließend die Proteinkinase B (FRUMAN, CANTLEY, 2002).

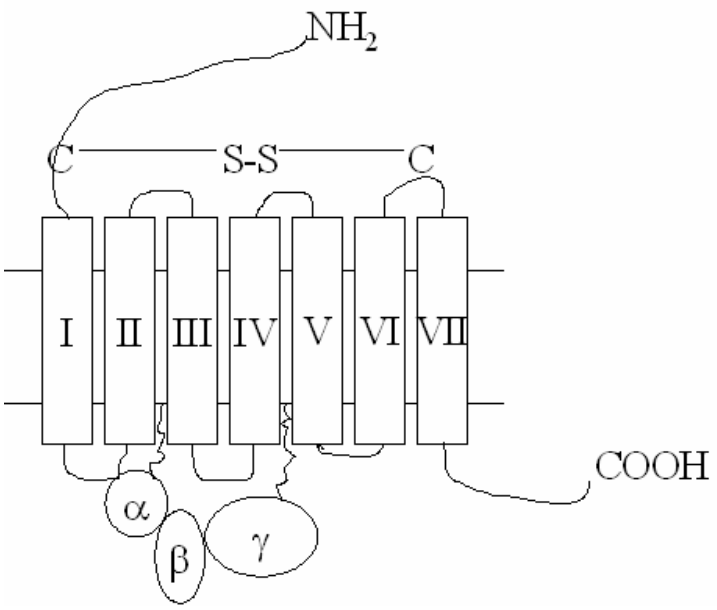


Abb. 4: Schematische Darstellung von Chemokinrezeptoren. Ligandenbindung und Spezifität werden durch die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrückenbindung zwischen dem Aminoterminus und der dritten extrazellulären Schleife ermöglicht. Dies ist die Erkennungssequenz. Verglichen mit anderen GPCR besitzen Chemokinrezeptoren eine relativ kurze intrazelluläre dritte Schleife. Die drei intrazellulären Schleifen bilden die Binderegion für G-Proteine. Zusätzlich sind die Gα und die Gγ Untereinheiten durch Myristylierung und Isoprenylierung an der Innenseite der Zellmembran verankert (YOUN *et al.*, 2002).

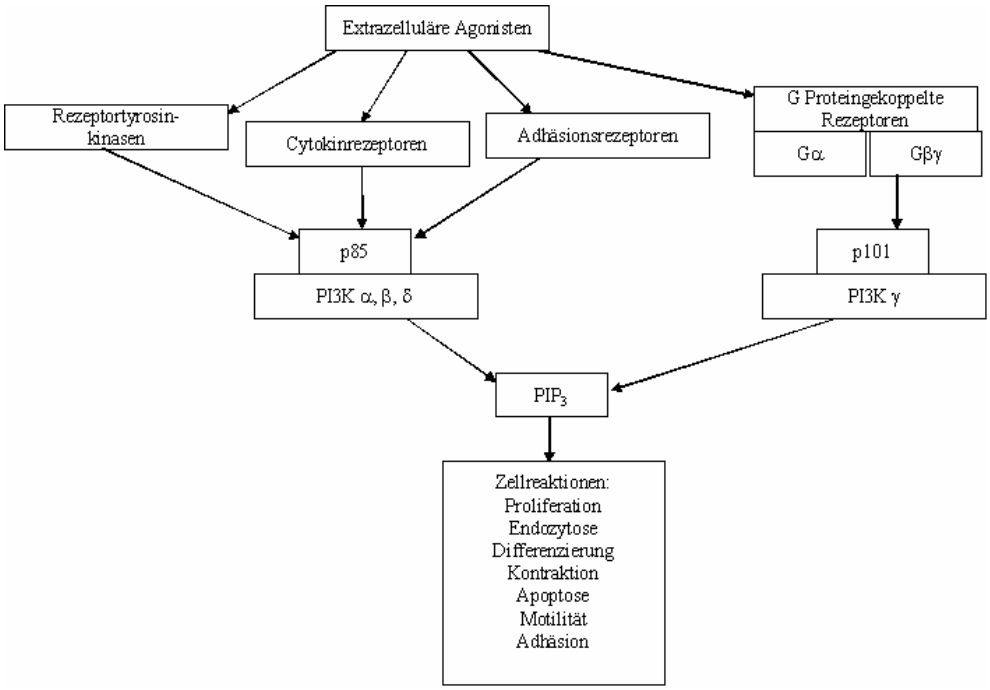


Abb. 5: Die vier PI3K-Isoenzyme in Säugerzellen als Mediatoren der Signaltransduktion. Die Lipidkinaseaktivität der PI3K wird durch spezifische Rezeptoren aktiviert (WETZKER, 2004).

1.2.2.2. Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren

Anaphylatoxine sind kleine Spaltprodukte von Komplementproteinen. Sie gehen nach der Aktivierung der Komplementkaskade durch proteolytische Spaltung aus den Faktoren C3, C4 und C5 als C3a, C4a und C5a hervor und gelten als proinflammatorische Peptide mit immunmodulierendem Charakter (JANEWAY, TRAVERS, 2002; WARD, 2004). Eine ihrer Hauptfunktionen ist die Rekrutierung von Leukozyten. Diese wandern dann zu den Orten von Infektionen, Entzündungen und Traumata. Gemeinsame strukturelle Merkmale der Anaphylatoxine sind drei intramolekulare Disulfidbrücken und die C-terminale Aminosäure Arginin (HUGLI, 1984). Komplementspaltprodukte werden durch spezifische Rezeptoren erkannt, die sich auf Endothelzellen, Mastzellen und Phagozyten (Monozyten, Makrophagen, unreifen DC, neutrophilen Granulozyten) befinden. Durch die Bindung der Anaphylatoxine an zugehörige Rezeptoren kommt es zum Flüssigkeitseinstrom und zur Einwanderung von inflammatorischen Zellen in den Ort der Entzündung. Eine übermäßige Produktion von Anaphylatoxinen führt zu einem generalisierten schockähnlichen Systemkollaps, der als anaphylaktischer Schock bezeichnet wird. Alle drei Anaphylatoxine bewirken eine Kontraktion der glatten Muskulatur und erhöhen die Gefäßpermeabilität. C5a und C3a induzieren die Produktion von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßendothel und aktiveren Gewebsmastzellen. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Histamin und TNF-α (JANEWAY, TRAVERS, 2002; WARD, 2004).

C5a ist, gefolgt von C3a, das Anaphylatoxin mit der höchsten biologischen Wirkung *in vivo* (JANEWAY, TRAVERS, 2002; WARD, 2004). Es ist ein potentes Chemotaxin für Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und DC (McWILLIAM *et al*., 1996; MORELLI *et al*., 1996; SOZZANI *et al*., 1995; YANG *et al*., 2000). In Bezug auf unreife DC verhält sich C5a wie die inflammatorischen Chemokine RANTES, MIP-1α oder MCP-3. Im Unterschied zu diesen soll nach Meinung von YANG *et al*. das Anaphylatoxin C5a auch ein ebenso starker chemotaktischer Stimulus für reife DC sein (YANG *et al*., 2000).

Anaphylatoxinrezeptoren sind Mitglieder der G-Protein-gekoppelten Sieben-Helix-Rezeptoren (BOULAY *et al*., 1991; GERARD, GERARD, 1991; LANGKABEL *et al*., 1999). Ende der siebziger Jahre wurden C5aR (CHENOWETH *et al*., 1978) und C3aR (GLOVSKY *et al*., 1979) auf humanen Granulozyten beschrieben. C5aR war der erste Anaphylatoxin-Rezeptor, dessen molekulare Struktur aufgeklärt wurde. Er besteht aus 350 Aminosäuren. Der N-Terminus liegt extra-, der C-Terminus intrazellulär (WETSEL, 1995). 1996 wiesen WERFEL *et al*. erstmals nach, dass auch $CD14^+$ humane Monozyten C5aR

exprimieren (WERFEL *et al*., 1996A). Vier Jahre später berichteten Werfel *et al*. über das Vorkommen von C5aR auf humanen Mastzellen und Makrophagen der Haut (WERFEL *et al*., 1996B, WERFEL *et al*., 1997). Im Jahr 1997 gelang Gasque *et al*. der Nachweis von C5aR auf humanen Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothelzellen des zentralen Nervensystems (GASQUE *et al*., 1997).

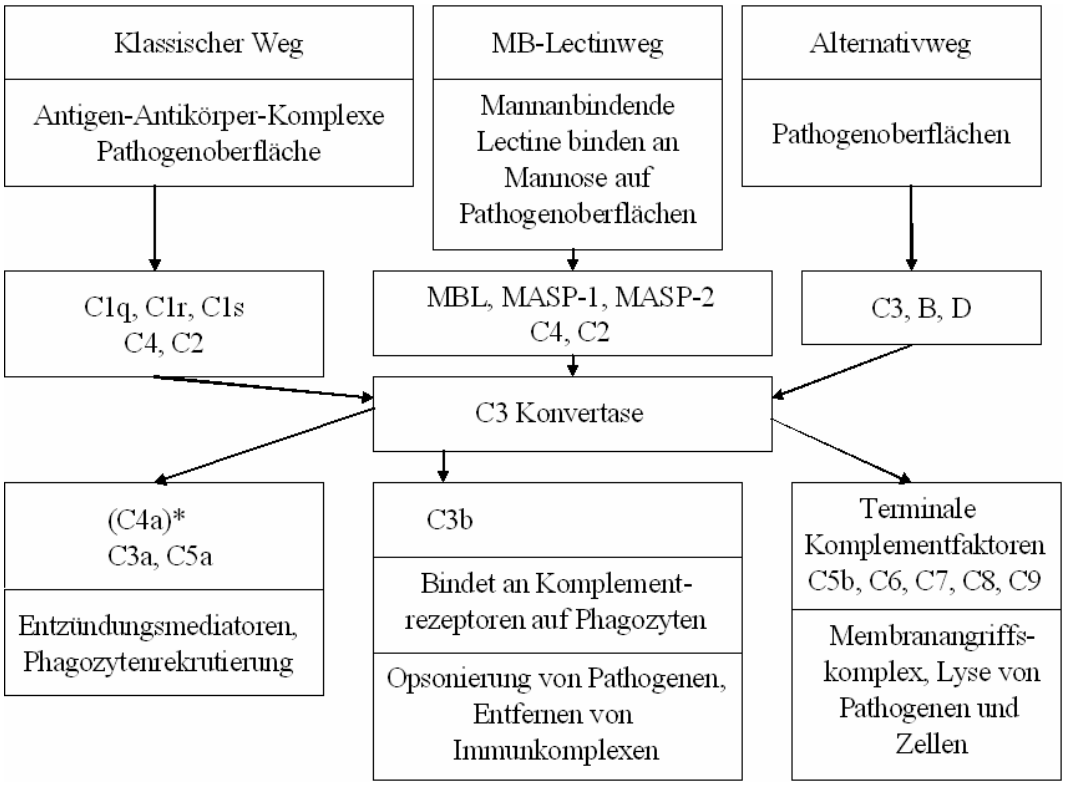


Abb. 6: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten und Reaktionen. Die frühen Prozesse der drei Aktivierungswege enthalten eine Reihe von Spaltungsreaktionen, die alle in der Bildung von C3a und C3b aus C3 gipfeln. Diese Reaktion wird durch das Enzym C3-Konvertase katalysiert. C3b bindet kovalent an Bakterienzellmembranen und opsoniert diese dadurch, C5a und C5b entstehen bei der Spaltung von C5 durch die C5-Konvertase, die aus der C3-Konvertase und gebundenem C3b besteht. C5b treibt die späten Prozesse, die zur Bildung des Membranangriffskomplexes führen, an. Der Membranangriffskomplex bildet sich in der Membran von Zielzellen, die daraufhin ihre Zellintegrität nicht aufrechterhalten können. * C4a wird während der frühen Prozesse gebildet und nicht in Abhängigkeit von der C3-Konvertase. C4a besitzt eine schwache biologische Wirkung, C4b ist ein schwaches Opsonin (JANEWAY, TRAVERS, 2002).

1.2.2.3. Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine (chemoattractant cytokines) gehören zu den Cytokinen. Sie bilden eine Familie von mehr als 50 strukturell verwandten kleinen Proteinen (6-14 kDa) mit chemotaktischer Wirkung und stimulieren Migration, Differenzierung und Aktivierung von Zellen, speziell von Phagozyten und Lymphozyten, und besitzen eine zentrale Rolle bei der Anlockung und Einwanderung von Leukozyten in Entzündungsherde und sekundäre lymphatische Organe

(DIEU *et al*., 1998; DIEU-NOSJEAN *et al*., 1999; LUSTER, 1998; LUSTER, 2001; ZLOTNIK *et al*., 1999). Chemokine werden entweder konstitutiv oder im Verlauf inflammatorischer Reaktionen sezerniert (BAGGIOLINI *et al*., 1997). Sie können von verschiedensten Zelltypen wie Phagozyten, Lymphozyten, Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen als Reaktion auf bakterielle Produkte, Viren und mechanischen Stress freigesetzt werden und fungieren als Lockstoff für Zellen mit entsprechenden Rezeptoren. Diese Zellen wandern entlang des Chemokingradienten in Richtung der höchsten Konzentration. Chemokine besitzen einen ähnlichen Grundaufbau. Sie bestehen aus einer N-terminalen Schleife, drei antiparallelen, miteinander in Verbindung stehenden β-Strängen und einer C-terminalen α-Helix (BAGGIOLINI *et al*., 1997). Der größte Teil der Chemokine weist vier Cysteine auf, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ihre Einteilung erfolgt anhand der Stellung und der Anzahl der Cysteine im N-Terminus. Man unterscheidet deshalb CXC-, CC-, C- und CX_3C-Chemokine.

Anhand dieses Ligandenspektrums lassen sich die vier Chemokinrezeptortypen unterteilen. Es gibt CR, CCR, CXCR, CX_3CR. Innerhalb einer Rezeptorgruppe ist die Sequenzähnlichkeit sehr hoch. Dies lässt vermuten, dass sie sich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben. Die Fähigkeit, eine große Anzahl von strukturell verschiedenen Liganden binden zu können, ist eine Eigenschaft vieler Chemokinrezeptoren (JANEWAY, TRAVERS, 2002). Chemokinrezeptoren gehören alle zu den G-Protein-gekoppelten Sieben-Helix-Rezeptoren. Auch sie enthalten Cysteinreste, die über eine Disulfidbrücke zur für die Ligandenbindung wichtigen Rezeptorkonformation beitragen. Allen Chemokinrezeptoren ist eine identische zweite intrazelluläre Schleife in der dritten transmembranen Region gemeinsam (BAGGIOLINI *et al*., 1997; MURPHY, 2000). Die Expression von Chemokinrezeptoren hängt ab vom Zelltyp sowie von dem Aktivitäts- und Differenzierungsgrad der Zelle (LUSTER, 2001). Beispielsweise gelten die Mitglieder der CC-Familie als typische Chemokine für die Monozytenwanderung. Die meisten Mitglieder der CC-Familie sind auf Chromosom 17 und die meisten CCRs auf Chromosom 3 codiert (JANEWAY, TRAVERS *et al*., 2002). Beispiele für diese Chemokine und ihre Rezeptoren sind MCP (monocyte chemotactic protein, wirkt auf T-Lymphozyten, Monozyten und basophile Granulozyten), RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, wirkt auf T-Gedächtniszellen und Monozyten) und MIP-1α (macrophage inflammatory protein 1α) (BAGGIOLINI *et al*., 1997). Aktuell werden zehn CC-Rezeptoren (CCR1-10) unterschieden (LUSTER, 2001). Defizienzen in der Produktion bestimmter Cytokine oder deren Rezeptoren führen zu einer beeinträchtigten Fähigkeit, Entzündungsreaktionen zu initiieren. Des Weiteren sind

Chemokinrezeptoren als Corezeptor für Pathogene wie, HIV, SIV, FIV u.a., von großem Interesse für die Forschung.

1.3. PROBLEMSTELLUNG

Ein Hauptmerkmal von unreifen DC ist ihre Fähigkeit in Richtung von inflammatorischen Chemotaxinen wie Anaphylatoxinen und Chemokinen zu wandern. Dies ermöglicht den unreifen DC zu den Orten der Entzündung zu gelangen wo sie Antigen aufnehmen können. Damit wird ihre Ausreifung induziert (SOZZANI *et al*., 1995; SOZZANI *et al*., 1997). Der Reifungsprozess führt durch den Einfluss inflammatorischer Stimuli zur Herunterregulierung von Rezeptoren für inflammatorische Chemotaxine (CAUX *et al*., 2000) und gleichzeitig zur Hochregulation von CCR7, dem Rezeptor für die konstitutiven Chemokine CCL19 und CCL21. Dieser Prozess ist Voraussetzung für die Migration der DC zu den sekundären Lymphorganen (DIEU *et al*., 1998; SALLUSTO *et al*., 1998).

PGE_2 als potenter Modulator von Immunantworten (TILLEY *et al*., 2001; HARRIS *et al*., 2002) wird derzeit zusammen mit anderen proinflammatorischen Mediatoren häufig zu Reifung von MoDC für experimentelle und klinische Zwecke eingesetzt (JONULEIT *et al*., 1997). Die PGE_2-abhängige CCL19/CCL21-vermittelte Signaltransduktion und Migration von DC ist durch einen anderen Mechanismus reguliert als die Modifikation der Expression des zugehörigen Rezeptors CCR7 (SCANDELLA *et al*., 2002; SCANDELLA *et al*., 2004; LUFT *et al*., 2002). Es ist bekannt, dass PGE_2 für die DC-Mobilisierung in Richtung des proinflammatorischen Anaphylatoxin C5a zwingend benötigt wird, ohne allerdings die C5aR Expression signifikant zu beeinflussen. PGE_2 scheint grundsätzlich für die Regulierung des Migrationsverhaltens von DC notwendig zu sein (LEGLER *et al*., 2006).

IL-4 ist in Kombination mit GM-CSF unabdingbar für die Generierung von DC aus Monozyten *in vitro* (SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994; ROMANI *et al*., 1994). Monozyten kultiviert mit IL-4 und GM-CSF entwickeln sich zu unreifen DC. IL-4 ist in der Lage, die Migartionskapazität von DC zu beeinflussen, da dieses Cytokin die Expression und die Funktion der Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C3aR herunterreguliert (SORURI *et al*., 2003A). IL-13, ebenfalls ein prototypisches TH2-Cytokine, kann wegen seiner funktionellen Überlappung mit IL-4 durch die gemeinsame Verwendung von IL-4Rα und der damit verbundenen Signaltransduktionswege (Janus-Kinase/Signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) Pfad, PI3K und MAPK Aktivierung) ebenfalls für die Generierung von unreifen DC herangezogen werden (PIEMONTI *et al*., 1995; CHATILA, 2004; KELLY-WELCH, 2003).

Da die Wanderungsfähigkeit eine kritische Funktion der DC darstellt, sollten in dieser Studie folgende Aspekte näher beleuchtet werden:

(1) Einfluss von IL-4/IL-13 auf die Migrationseigenschaften von DC und Monozyten/Makrophagen in Richtung verschiedener inflammatorischer Chemotaxine

(2) Untersuchung der an der IL-4/IL-13 induzierten Modulation der chemotaktischen Rezeptoren beteiligten Signaltransduktion

(3) Untersuchung der regulatorischen Rolle von PGE_2 auf die Expression und Funktion ausgewählter chemotaktischer Rezeptoren

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Medien, Seren, Puffer

Adhärenzmedium	RPMI 1640; 5 % autologes Serum; 100 IU/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
Ampullenwasser 10 l	zum Ansetzen von Puffern u.a., Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Blocking-Reagenz	γ-Globulin, human, Cohn-Fraktion II, III, 1 g, Sigma
BMDC-Medium	RPMI 1640; 5 % FCS; 100 IU/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin, 1 µM β-Mercaptoethanol, 1% Non Essential Amino Acids 100x
BSA Fraktion 5	Serva, Heidelberg
CB-Kryomedium	20 % FCS, 10 % DMSO in IMDM
Chemotaxismedium	RPMI 1640; 1% BSA; 100 IU/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
Erythrozytenlysispuffer	0,15 mmol/l NH_4Cl; 1,0 mmol/l $KHCO_3$; 0,1 mmol/l Na_2EDTA; pH 7,4
FACS-Puffer	490 ml PBS; 2,5 ml 20 % NaN_3 (Natriumacid); 7,5 ml FCS
FACS-Fix	PBS mit 1 % Formalin
FCS	Fetales Kälberserum, FCS wurde für 30 min bei 56°C inaktiviert, Cambrex, Verviers, Belgien
Hämacolor Schnellfärbung	Merck, Darmstadt
Humanes autologes Serum	Blutbank, Universitätsklinikum Göttingen
IMDM	Cambrex, Verviers, Belgien
Indo-1	Invitrogen, Karlsruhe
Krebs-Ringer-Lösung	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM D-Glucose, 10 mM HEPES, 1mM $CaCl_2$
Kulturmedium	RPMI 1640; 10 % FCS; 100 IU/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

Medium I	RPMI 1640; 5 % FCS; 100 IU/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
Non Essential Amino Acids 100x	Biochrom, Berlin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung Dulbecco`s Formula, Serva, Heidelberg
PKH 26	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pluronic F127	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Cambrex, Verviers, Belgien
Trypanblau	Merck, Darmstadt

2.1.2. Medienzusätze, Cytokine, Chemokine, Anaphylatoxine

rh C5a	Abteilung für Immunologie, Universität Göttingen, Prof. Zwirner
rh C3a	Abteilung für Immunologie, Universität Göttingen, Prof. Zwirner
rh Flt3-L	Pepro Tech Inc Tebu, USA
fMLP	Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe
rh GM-CSF	R&D Systems
rm GM-CSF	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rh IL-4	R&D Systems
rm IL-4	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rh IL-10	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rm IL-10	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rh IL-13	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rm IL-13	Pepro Tech Inc Tebu, USA
Ionomycin, Calciumsalz	Sigma, Saint Louis, USA
JNK Inhibitor II	Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach
LL37	Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe
LPS	Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach
LY 294002	Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach
rh MCP-1	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rm MCP-1	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rm M-CSF	Pepro Tech Inc Tebu, USA

rh MDC	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rm MDC	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rh MIP-1α	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rm MIP-1α	Pepro Tech Inc Tebu, USA
PD 98059	Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA, Cölbe
PGE_2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SB 203580	Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach
rh SCF	Pepro Tech Inc Tebu, USA
rh TNF-α	R&D Systems, Wiesbaden
rh TPO	Pepro Tech Inc Tebu, USA

2.1.3. Reagenzien, Testkitts, Chemikalien

NH_4Cl	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
Ethanol	absolut, unvergällt, Merck, Darmstadt
Formalin	37%ig (v/v), Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
$KHCO_3$	Merck, Darmstadt
MACS-Separationskit für $CD34^+$ Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na_2EDTA	Merck, Darmstadt
NaN_3	Merck, Darmstadt
Trennmedium	Lymphoprep™, d = 1,077 g/ml +/- 0,001g/ml, Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen

2.1.4. Kulturgefäße, Pipetten und andere Materialien

in vitro Chemotaxiszubehör	8 µm, Transwell® Permeable Supports, Corning, Beyer-Laborbedarf, Düsseldorf, New York, USA
Einmalspritzen	1 ml, 10 ml, 20 ml, B. Braun, Melsungen

Eppendorf-Varipetten	0,1 – 2,5 µl, 1 – 20 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
FACS-Platten	96 Rundbodenwells, Greiner, Nürtingen
FACS-Röhrchen	5 ml, 75 x 12 mm ϕ, Sarstedt, Nümbrecht, 5 ml, 75 x 12 mm ϕ, BD, Erembodegem, Belgien
Glasgeräte, Glaspipetten	Schütt, Göttingen
Kryoröhrchen	2 ml, Corning Incorporated New York
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen	blau, gelb, Sarstedt, Nümbrecht Weiß, Dunn, Asbach
Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences Pipetboy acu
Reagiergefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette Z, 9 ml	Serummonovette, Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	0,2 µm, 0,45 µm, Minisart-plus, Sartorius, Göttingen
TC-Schalen	1 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, Sarstedt, Nümbrecht
6-Well-TC-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
24-Well-TC-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	15 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	50 ml, Sarstedt, Nümbrecht

2.1.5. Tierversuche

Mausstamm Balb/c	Knochenmarksaufreinigung, syngene *in vivo* Wanderungsversuche mit PKH gefärbten Balb/c Zellen
Mausstamm C57/BL6	Knochenmarksaufreinigung, syngene *in vivo* Wanderungsversuche mit PKH gefärbten C57/BL6 Zellen
Mausstamm SCID CB-17	xenogene *in vivo* Wanderungsversuche mit humanen Zellen, Gewicht 19-24 g, Charles River, Sulzfeld
Mausstamm Balb/c-STAT6-/-	Knochenmarksaufreinigung, Jackson Laboratory

Narkose	Hostaket, Intervet
	Rompun, Bayer, Leverkusen

2.1.6. Laborgeräte

Autoklav	Certoclav Hochdruck-Dampfsterilisator, Gruber & Kaja, Druckguß und Metallwarenfabrik, Traun Wien, Österreich
Brutschrank	Heraeus CO_2-Auto Zero, Sollwerteinstellung, CO_2: 5%, T: 37°C
Durchflusszytometer	FACS-Coulter EpicsXL-MCL
	LSR II, Becton Dickinson
	Calibur, Becton Dickinson
Durchlichtmikroskop	mit Halterung für NEUBAUER-Zählkammer, Zeiss, Oberkochen
Invertmikroskop	Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen
Kamera	Nikon Coolpix 990
Kameramikroskop	Axiophot, Zeiss, Oberkochen
Shaker	Thermo Stat plus, Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Schütt Labortechnik
	KBT 100-1P, HLC PROGR;
	Thermomixer 5436, Eppendorf
Zentrifugen	Labofuge 400 R mit Kühlfunktion, Heraeus, Hanau;
	Plattenzentrifuge Megafuge 1.OR mit Kühlfunktion Heraeus, Hanau;
	Varifuge 3.OR mit Kühlfunktion, Heraeus, Hanau;
	Centrifuge 5415 D, Eppendorf
	Centrifuge 5417 R, Eppendorf
	Cytopro™ Cytocentrifuge 7620, Wescor

2.1.7. Computersoftware

Textverarbeitung	Word
Tabellenkalkulation	Excell
FACS-Analyse	WinMDI, FlowJo

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von humanen Zellen

2.2.1.1. Isolierung von $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Prinzip:

Magnetpartikel gekoppelte Antikörper binden an ihr komplementäres Antigen und halten die so markierten Zellen im Magnetfeld gefangen, während nicht markierte Zellen das Magnetfeld passieren. Auf diese Weise isolierte Zellen können durch Eluieren gewonnen und weiterverarbeitet werden (Kultivierung, FACS-Färbung usw.).

Reagenzien:

Waschpuffer: PBS
EDTA 2 mmol/l
BSA 0,5%
Lymphoprep™ (RT)
MACS Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit: monoklonal Maus anti-human CD34 (Maus IgG1, Klon QBEND/10)

Durchführung:

Durch 2 M EDTA antikoaguliertes Nabelschnurblut wurde 1:4 bis 1:5 mit Waschpuffer verdünnt, gut durchmischt, jeweils 25 ml auf 15 ml Lymphoprep™ (siehe auch 2.2.1.2.) in 50-ml-Röhrchen vorsichtig aufgeschichtet und für 20 min bei 400 g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde der Großteil des gelblichen Überstandes abgesaugt und die daran angrenzende Interphase in neuen 50-ml-Röhrchen gepoolt und mit Waschpuffer gewaschen (10 min bei 200 g und RT ohne Bremse). Nach Vereinigen der Pellets wurde abermals zentrifugiert für 5 min bei 200 g bei RT mit Bremse, der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml Erythrozytenlysispuffer aufgenommen und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Röhrchen bis 50 ml mit Waschpuffer aufgefüllt und wieder für 5 min bei 200 g und RT mit Bremse zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte das Resuspendieren

des Pellets in 300 µl Waschpuffer/10^8 Zellen. Durch Zugabe von 100 µl Fc-Blocking-Reagenz/10^8 Zellen und Inkubation auf Eis für 20 min sollten die Fc-Rezeptoren der Zellen abgesättigt werden, um unspezifische Bindungen mit den Anti-CD34-Antikörpern zu vermeiden. Während der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension ab und zu vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Blockantikörper zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl CD34-Microbeadlösung/10^8 Zellen. Nach einer 30 minütige Inkubation bei 4°C unter ständigem Durchmischen wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit Puffer gewaschen, in 1000 µl Puffer aufgenommen und auf eine MS-Säule, die im Magnetfeld des MACS-Separators platziert war, pipettiert. Die Säule wurde vollständig mit Puffer durchgespült und danach mit der Zellsuspension versehen. Nachdem die Suspension die Säule passiert hat und diese drei Mal mit Puffer gespült wurde, konnte sie aus dem Magnetfeld entfernt und in einem geeigneten Auffangröhrchen platziert werden. Nun erfolgte die Zugabe einer ausreichenden Menge Waschpuffer und mit dem zur Säule gehörenden Stempel drückte man die Zellen aus der Säule heraus. Der Vorgang wurde wiederholt, um sicherzugehen, dass alle in der Säule vorhandenen Zellen ausgewaschen wurden. Nach der Bestimmung der Anzahl der eluierten Zellen, wurden diese durch Zentrifugation pellettiert, anschließend in einer entsprechenden Menge IMDM-Medium (2 bis 3 x 10^5 Zellen/ml) inklusive der Cytokine Flt3-Ligand (25 ng/ml), TPO (10 ng/ml) und SCF (20 ng/ml) aufgenommen und auf eine 6-Well-Platte überführt (5 x 10^5 Zellen/ml, 2 ml/Well). Alle Arbeitsschritte sind so zügig wie möglich durchzuführen. Erscheint die Zellsuspension klumpig oder treten sichtbare Gerinsel auf, so ist die Suspension durch ein vorher angefeuchtetes Sieb oder Nylonnetz zu geben, um ein Verstopfen der Separationssäule zu vermeiden.

Die Dauer der Kultivierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen erfolgte in Abhängigkeit ihres Proliferationsverhaltens über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen. Danach wurden die suspendierten Zellen geerntet, gezählt und 1x10^7/ml in CB-Kryomedium in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder die Zellen unter Wechsel der Cytokine vom Proliferationscocktail zu GM-CSF mit und ohne IL-4 für zwei Wochen weiterkultiviert. Anteilig wurden GM-CSF/IL-4 Zellen zwei Tage vor der Ernte mit 250 ng/ml LPS stimuliert und somit innerhalb von 48 h zur Ausreifung gebracht. Zweck der LPS Stimulation war es, zu überprüfen, ob die Zugabe eines Reifungsmediators zur Ausbildung DC-spezifischer Oberflächenantigene führt.

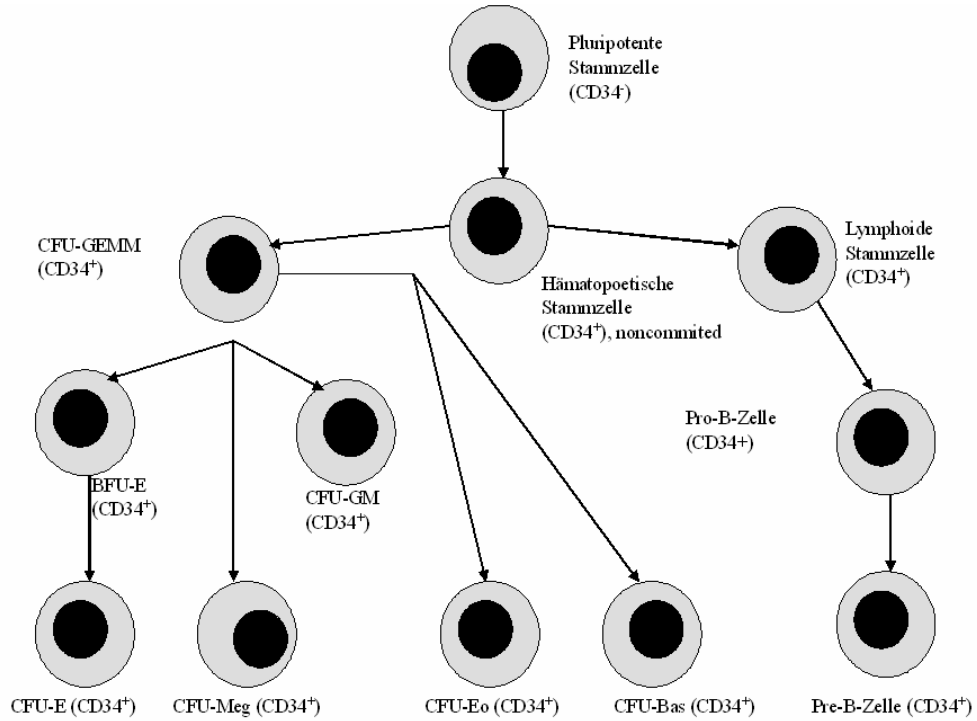


Abb. 7: CD34-Expression bei hämatopoetischen Zellen. Die pluripotenten Stammzellen sind in ihrer Entwicklung noch nicht festgelegt und können sich durch die Einwirkung spezifischer Mediatoren in verschiedene Richtungen entwickeln. Dieser Vorgang kann *in vitro* durch die Zugabe eines Cytokincocktails induziert werden. Je nach Art des Cocktails lassen sich Zellen verschiedener Populationen generieren. Die $CD34^+$ Zellen mit bereits festgelegter Entwicklungsrichtung können *in vitro* in Abhängigkeit ihrer Reihenzugehörigkeit überleben oder sie werden aufgrund fehlender Entwicklungs- und Differenzierungssignale apoptotisch. Auf diese Weise erhält man nach Ablauf der Kultivierung eine hohe Reinheit an gewünschten Zellen (Produktinformation MILTENYI BIOTEC MACS).

2.2.1.2. Leukaphereseaufarbeitung

Prinzip:

Die Leukapherese oder Leukopherese ist eine Methode zur Auftrennung von Spenderblut. Hierbei gewinnt man ein Leukozytenkonzentrat. Andere Blutbestandteile, wie Plasma und Erythrozyten, werden dem Spender größtenteils zurückgegeben. Die Aufarbeitung des Leukozytenkonzentrates mittels einer Dichtegradientenzentrifugation über Lymphoprep™ (5,6%w/v) erlaubt die Gewinnung von peripheren blutmononukleären Leukozyten (PBMNL). Lymphoprep ist ficollhaltig. Ficoll selbst ist eine kolloidale Lösung aus Methylcellulose. Diese gewährleistet die Aggregation der noch enthaltenen Erythrozyten. Die Oberflächen der roten Blutzellen sind stark negativ geladen und stoßen sich gegenseitig ab. Diese physiologisch notwendigen Abstoßungskräfte werden vom Ficoll herabgesezt. Somit wird die Sedimentation der Erythrozyten erleichtert. In Lymphoprep™ befindet sich außer Ficoll auch Natriummetrizoat (9,6%w/v). Diese Verbindung mit hoher Dichte gestattet die Auftrennung der einzelnen Zellarten in Abhängigkeit ihrer jeweiligen spezifischen Dichte.

Reagenzien:

Lymphoprep™ (RT)
PBS

Durchführung:

Das Leukozytenkonzentrat wurde in eine sterile Flasche überführt, im Verhältnis 1:1 mit PBS (RT) vermischt und je 25 ml der Zellsuspension auf jeweils 15 ml Lymphoprep in 50-ml-Röhrchen vorsichtig aufgeschichtet. Nach der Zentrifugation (20 min bei RT und 1000 g ohne Bremse) wurde der Großteil des gelblichen Überstandes abgesaugt, die daran angrenzende Interphase (sie enthält die PBMNL) gesammelt und in auf Eis vorgekühlte 50-ml-Röhrchen überführt. Diese wurden mit kaltem PBS aufgefüllt und bei 4°C und 1000 g ohne Bremse für 10 min zentrifugiert. Danach konnten die Überstände abgesaugt, die Zellpellets in 5 bis 10 ml kaltem PBS resuspendiert, die Röhrchen aufgefüllt und anschließend bei 400 g und 4°C für 5 min mit Bremse zentrifugiert werden. Dieser Waschschritt wurde so oft wiederholt, bis die Überstände klar waren. Nach Beendigung des Waschvorganges erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer.
Zur Gewinnung von autologem Serum wurden die der Leukapherese beigegebenen Serummonovetten bei 1700 g und RT für 10 min ohne Bremse zentrifugiert, die Überstände (Serum) gesammelt und die Serummonovetten mit dem verbleibenden Blutkuchen verworfen.

2.2.1.3. Gewinnung von Monozyten durch Adhärenz und ihre Kultivierung

Prinzip:

Die Adhärenz von Monozyten ist auf speziellen Kunststoffoberflächen möglich und kann auf diesem Wege für die Gewinnung dieser Zellen ausgenutzt werden. Die Fähigkeit zur Adhärenz verlieren die Monozyten während der Kultivierung relativ schnell, wenn sie durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 zu DC ausdifferenziert werden. Dieser Verlust der Adhärenzfähigkeit ist demzufolge reifungsabhängig (BJERKE, GAUDERNACK, 1985). Die durch die Leukapheresеaufarbeitung gewonnenen Zellen wurden in Abhängigkeit der nachfolgenden Versuche auf verschiedenen Zellkulturschalen und in unterschiedlicher Zahl ausplattiert:

TC-Schale 1 ml: 1,0 x 10^7 Zellen
TC-Schale 5 ml: 2,5 x 10^7 Zellen
TC-Schale 10 ml: 5,0 x 10^7 Zellen
TC-Schale 15 ml: 1,0 x 10^8 Zellen

Reagenzien:

Adhärenzmedium
PBS
Kulturmedium

Durchführung:

Die gewünschte Zellzahl der gewonnenen PBMNL wurde in Adhärenzmedium (1 ml für 1-ml-TC-Schalen, 3 ml für 5-ml-TC-Schalen, 6 ml für 10-ml-TC-Schalen, 10 ml für 15-ml-TC-Schalen) suspendiert und auf die für den Versuch vorgesehene Anzahl TC-Schalen verteilt. Anschließend inkubierten die Kulturen eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO_2), um die Monozyten adhärieren zu lassen. Danach wurden die Überstände, welche die nicht adhärenten Lymphozyten enthielten, abgesaugt und die TC-Schalen wenige Male vorsichtig mit warmem PBS abgespült (5 ml PBS bei 1-ml-TC-Schalen, 15 ml PBS bei 5-ml-TC-Schalen, 30 ml PBS bei 10-ml-TC-Schalen, 75 ml bei 15-ml-TC-Schalen), um die restlichen Lymphozyten zu entfernen. Dann erfolgte die Zugabe von 37°C warmem Kulturmedium (1 ml bei 1-ml-TC-Schalen, 5 ml bei 5-ml-TC-Schalen, 10 ml bei 10-ml-TC-Schalen, 15 ml bei 15-ml-TC-Schalen) und Cytokinen. Ansätze, die sieben Tage kultiviert werden sollten (37°C, 5% CO_2), wurden am dritten und fünften Tag gefüttert. Hierfür wurde die Hälfte des Mediums entnommen, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und durch neues Kulturmedium und entsprechende Cytokinmengen ersetzt. Die Aufarbeitung von Leukapheresen/Vollblut/Nabelschnurblut erfolgte zur Vermeidung von Infektionen unter der Sicherheits-Sterilbank (Klasse II).

2.2.1.4. Kulturzusätze im humanen System

Je nach Fragestellung erfolgte die Zellkultivierung mit verschiedenen Cytokinansätzen in 6-Well-TC-Platten oder TC-Schalen.

Reagenzien:

Tab. 1: Art und Menge der verwendeten Cytokine und Mediatoren im humanen System

Mediatoren	eingesetzte Menge	
	Leukapherese bzw. Vollblut	Nabelschnurblut
- rh GM-CSF	300 U/ml	300 U/ml
- rh Flt3-L		25 ng/ml
- rh IL-4	300 U/ml	300 U/ml
- rh IL-10	200 U/ml	
- rh IL-13	200 U/ml	
- LPS		250 ng/ml
- rh M-CSF	20 ng/ml	
- PGE-2	1 µM/ml	
- rh SCF		20 ng/ml
- rh TPO		10 ng/ml
- rh TNFα		10 ng/ml

Durchführung:

Tab. 2: $CD34^+$ hämatopoetische Stammzellen wurden unter folgenden Cytokinsituationen kultiviert

Kultivierung	Cytokinansatz
bis zu 8 Wochen	SCF, TPO, Flt3-L
2 Wochen	GM-CSF, GM-CSF/IL-4

Tab. 3: Monozyten aus der Leukapherese bzw. Vollblut wurden unter folgenden Cytokinsituationen kultiviert

Dauer der Kultivierung	Cytokineansätze
2 Tage	ohne Cytokine, GM-CSF, IL-4 , PGE_2, IL-4/PGE_2, GM-CSF/IL-4; GM-CSF/PGE_2, GM-CSF/IL-4/PGE_2, M-CSF, M-CSF/IL-4
3, 5 bzw. 7 Tage	GM-CSF, GM-CSF/IL-4, GM-CSF/IL-4/PGE_2, MCSF, M-CSF/IL-4

2.2.1.5. Kryokonservierung

Prinzip:

Unter Verwendung von DMSO (Dimethylsulfoxid) können Zellen über einen langen Zeitraum in flüssigem Stickstoff eingelagert werden. Das DMSO dient der Vermeidung der Entstehung von großen Eiskristallen, welche die Zellwände zerstören würden. Durch den Einsatz einer vorgekühlten Styroporbox wird eine Einfrierkinetik von 1°C/min gewährleistet.

2.2.1.5.1. Einfrieren von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Reagenzien:

CB-Einfriermedium

Durchführung:

Die Überstände der Kulturen wurden gepoolt, die 6-Well-TC-Platten mit PBS gespült und bei 400 g und RT für 5 min zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in das auf Eis vorgekühlte Einfriermedium aufgenommen, in gekühlte Kryoröhrchen überführt und sofort bei –70°C in einer Styroporbox eingefroren ($1x10^7$ Zellen/ml Einfriermedium). Am nächsten Tag war die Zellsuspension vollständig durchgefroren und die Kryoröhrchen konnten in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.2.1.5.2. Auftauen von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Reagenzien:

CB-Kulturmedium

Durchführung:

Ein Kryoröhrchen mit eingefrorenen Zellen wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet und etwas kaltes CB-Kulturmedium hinzugetropft. Dadurch begann das Einfriermedium aufzutauen. Die aufgetaute Suspension wurde in CB-Kulturmedium pipettiert und abermals etwas CB-Kulturmedium in das Kryoröhrchen getropft. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das gesamte CB-Kryomedium mit den darin enthaltenen Zellen in CB-Kulturmedium überführt worden war. Das langsame Ausdünnen ist wichtig, da sonst das im Einfriermedium enthaltene DMSO nach dem Auftauen auf die Zellen toxisch wirkt. Durch die Verdünnung mit CB-Medium konnte die DMSO-Konzentration stark herabgesetzt werden. Die Suspension wurde nun bei RT und 400 g für 5 min zentrifugiert, dann die Zellen in warmem Medium aufgenommen, anschließend die Zellzahl bestimmt, mit CB-Kulturmedium auf die gewünschte Zellzahl (5×10^5 Zellen/ml) eingestellt, die entsprechenden Cytokine hinzugegeben und die Zellsuspension ausplattiert.

2.2.1.6. Vitalistätstest

Prinzip:

Der Azofarbstoff Trypanblau wird verwendet, um den Anteil vitaler Zellen nach einer Aufreinigung, Ernte oder einer ähnlich traumatisierenden Prozedur zu bestimmen. Tote Zellen weisen eine veränderte Membrandurchlässigkeit auf. Trypanblau kann deshalb ungehindert eindringen und färbt diese Zellen umgehend blau. Man kann sie dadurch im lichtmikroskopischen Bild von den hell erscheinenden vitalen Zellen sehr gut unterscheiden. Die Zählung sollte sofort nach der Anfärbung erfolgen, da auch lebende Zellen nach einiger Zeit den Farbstoff aufnehmen.

Reagenzien:

Trypanblau

Durchführung:

Ein Aliquot (10 µl) der zu untersuchenden Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau vermischt und die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop bei 400 facher Vergrößerung in einer Zählkammer ermittelt.

2.2.1.7. Ernte der Zellen aus Leukapherese

Die Kulturschalen der aus Leukapherese gewonnenen Zellen wurden für mindestens 30 min auf Eis gestellt, damit sich die teilweise noch adhärenten Zellen vom Boden der Schale lösen konnten. Danach wurden die Zellen mit einem kräftigen PBS-Strahl abgespült. Die 6-Well-Platten mit den aus Nabelschnurblut gewonnenen Zellen wurden nicht auf Eis inkubiert, sondern die Überstände entnommen und die Wells vorsichtig zweimal mit PBS nachgespült. Ob die Zellernte unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden musste oder nicht, war abhängig von den sich anschließenden Experimenten. Für *in vivo* Versuche war die Sterilität unabdingbar, für alle anderen Versuche nicht.

2.2.1.8. Ernte der aus Nabelschnurblut generierten Zellen

Da es sich bei den kultivierten hämatopoetischen Vorläuferzellen um eine sehr heterogene Population handelt und ein gewisses Maß an Heterogenität während der gesamten Kultivierung erhalten bleibt, findet man sowohl adhärente als auch nicht adhärente Zellen vor. Von Interesse sind dabei die nicht adhärenten Zellen. Diese wurden sowohl beim Wechsel von Wachstumsfaktoren auf GM-CSF bzw. GM-CSF/IL-4 als auch bei der eigentlichen Zellernte weiter verwendet. Die Überstände wurden abgenommen und die Wells vorsichtig zweimal mit PBS nachgespült und die Zellen gepoolt.

2.2.2. Kultivierung von Mauszellen

2.2.2.1. Gewinnung, Kultivierung und Ernte von Mausknochenmarkszellen

Prinzip:

Die im Knochenmark vorkommenden hämatopoetischen Stammzellen können durch definierte Cytokine in die jeweils erwünschte Entwicklungsrichtung getrieben werden.

Reagenzien:

PBS
Erythrozytenlysispuffer
BMDC-Medium

Durchführung:

In Abhängigkeit von der erwünschten Anzahl an Zellen wurde die benötigte Menge an Mäusen durch den Einsatz von CO_2 getötet, die Oberschenkel- und Schienbeinknochen unter sterilen Bedingungen frei präpariert und in PBS überführt. Die Knochenenden wurden angeschnitten, das Knochenmark mittels PBS-gefüllter Spritze in eine Petrischale ausgespült und die Suspension auf ein Sieb gegeben, um die restlichen Knochenstückchen und Gewebereste zu entfernen. Die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen pipettiert und für 10 min bei 300 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet durch das Resuspendieren in 5 ml Erythrozytenlysispuffer und einer anschließenden Inkubation von 5 min bei 37°C einer Erythrozytenlyse unterzogen. Danach wurde das Röhrchen mit PBS aufgefüllt, zentrfugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 10 ml KMDC-Medium resuspendiert und auf eine 10-ml-TC-Schale überführt. In den sich anschließenden 2 h konnten sich die adhärenten Zellen im Brutschrank am Boden der TC-Schale anheften. Danach wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und die Schale einmal vorsichtig mit PBS nachgespült. Die TC-Schale konnte nun verworfen werden. Der Überstand enthielt die nicht adhärenten Zellen, zu denen auch die hämatopoetischen Stammzellen gehören. Nach der Ermittlung der Zellzahl und dem Zentrifugieren (5 Minuten bei 300 g ohne Bremse) der Suspension, wurden die Zellen mit

KMDC-Medium auf 5 x 10^5/ml eingestellt. Jeweils ein Milliliter der Zellsuspension wurde pro Napf auf 24-Well-Platten ausplattiert. Die Zugabe von Cytokinen und deren Kombinationen war abhängig vom Versuchsziel.

Am dritten Tag wurden bei den GM-CSF haltigen Kulturen aus jedem Napf vorsichtig 500 µl Medium entnommen, gepoolt, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, neues Medium inklusive Cytokine zugegeben und 500 µl wieder auf die Wells verteilt. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen umgesetzt. Die Ernte der nicht adhärenten Zellen erfolgte durch Poolen und Spülen mit PBS. Nach der Zellzahlbestimmung wurde 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen mit KMDC-Medium auf 5 x 10^5/ml eingestellt, die entsprechenden Cytokine hinzugegeben und die Suspension zu je 3 ml pro Well auf 6-Well-Platten ausplattiert. Nach weiteren zwei Tagen erfolgte die Ernte der suspendierten Zellen.

Bei M-CSF haltigen Kulturen wurden am dritten und fünften Tag pro Well 500 µl entnommen aber verworfen und durch frisches Medium mit Cytokinen ersetzt. Die Ernte erfolgte am siebten Tag, indem die Kulturen 30 min auf Eis gestellt und anschließend die Wells mit PBS nachgespült wurden.

2.2.2.2. Kulturzusätze im Maussystem

Tab. 4: Art und Menge der im murinen System verwendeten Cytokine und Mediatoren

Cytokin bzw. Mediatoren	in Kultur eingesetzte Menge
- rm GM-CSF	100 U/ml
- rm IL-4	100 U/ml
- rm IL-10	200 U/ml
- rm IL-13	200 U/ml
- rm M-CSF	25 ng/ml
- LY 294002	5 µM
- SB 203580	5 µM
- JNK Inhibitor II	5 µM
- PD 98059	5 µM

Tab. 5: Cytokinsituationen bei der Kultiverung von hämatopoetischen Vorläufern aus Kochenmark von Mäusen

Dauer der Kultivierung	Cytokine
7 Tage nach Tag 5 bis 7	GM-CSF, GM-CSF/IL-4, M-CSF, M-CSF/ IL-4, Für 48 h LY 294002; SB 203580; JNK Inhibitor II; PD 98059

2.2.3. Zellbiologie

2.2.3.1. FACS-Färbung

Prinzip:

Bei der FACS-Färbung werden monoklonale Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, für die Markierung von membranständigen und intrazellulären Antigenen verwendet. Die Fluoreszenzen können anschließend in einem Durchflußzytometer gemessen werden. Ein Durchflußzytometer ermöglicht es, gleichzeitig mehrere wichtige Informationen über die gemessenen Zellen zu erhalten. Die zu untersuchenden Zellen werden durch eine feine Kapillare gedrückt und somit vereinzelt. Sie passieren in bestimmten Abständen einen Laserstrahl, der die Fluoreszenzfarbstoffe auf den Antikörpern anregt. Dadurch wird Licht definierter Wellenlänge emittiert und der Laser wird gestreut. Photodetektoren messen die Laserstreuung, die dann in ein elektronisches Signal umgewandelt werden kann. Man erhält nicht nur Information über membranständige bzw. intrazelluläre Strukturen, sondern gleichzeitig auch über Größe und Granularität der Zellen (JANEWAY, TRAVERS, 1997). Die Stärke der Expression von definierten Oberflächenmolekülen kann anhand der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität MFI beurteilt werden. Die verwendeten primären Antikörper waren entweder FITC- oder PE-markiert, bei der indirekten FACS-Färbung war der Sekundärantikörper FITC-markiert.

Reagenzien:

FACS-Puffer
FACS-Fix
Blocking-Reagenz

Tab.6: Für FACS-Färbung verwendete Antikörper

Spezifität	Zellklon	Isotyp	Markierung	Konzentration	Firma
hu C3aR	RZ8	Maus IgG2b	keine	5 µg/ml	Abt. für Immunologie, Universität Göttingen, ZWIRNER *et al*., 1999
hu C5aR	RZ1	Maus IgG1	keine	5 µg/ml	Abt. für Immunologie, Universität Göttingen, Prof. Zwirner
hu CCR1	53504111	Maus IgG2b	keine	5 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden
hu CCR2	48607	Maus IgG2b	keine	5 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden
hu CCR5	2D7/CCR5	Maus IgG2a	keine	5 µg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg
hu CCR7	150503	Maus IgG2a	keine	5 µg/ml	Abt. für Immunologie, Universität Göttingen, Prof. Zwirner
hu CD14	TÜK4	Maus IgG2a	FITC	5 µg/ml	DAKO, Dänemark
hu CD34	AC136	Maus IgG2a	PE	5 µg/ml	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
hu CD83	HB15a	Maus IgG2a	FITC	5 µg/ml	Immunotech Coulter, Marseille, Frankreich
hu CD86	B-T7	Maus IgG1	PE	5 µg/ml	DIACLONE SAS, Besancon, Frankreich
hu HLA-DR	L243	Maus IgG2a	PE	2,5 µg/ml	Leinco Technologies, Inc., St. Louis, USA
Isotyp Kontrolle	DAK-GO1 FITC DAK-GO5 PE	Maus IgG1 Maus gG2a	FITC PE	5 µg/ml	DAKO, Dänemark
mu C5aR	20-70-30-1	Ratte IgG2b	keine	5 µg/ml	Abt. für Immunologie, Universität Göttingen, SORURI *et al*., 2003 (C)
mu C3aR	1G4	Ratte IgG1	keine	5 µg/ml	Abt. für Immunologie, Universität Göttingen; Prof. Zwirner
mu CCR2	MC-21	Ratte IgG2b	keine	5 µg/ml	Prof. Dr. Matthias Mack Universität Regensburg MACK *et al*., 2001
mu CCR5	MC-68	Ratte IgG2b	keine	5 µg/ml	Prof. Dr. Matthias Mack Universität Regensburg MACK *et al*., 2001
F(ab´)2 Fragment	polyclonal	Goat anti rat	FITC	5 µg/ml	Dianova

2.2.3.1.1. Direkte Färbung membranständiger Antigene

Durchführung:

Die Zellen wurden geerntet und 2 x 10^6 Zellen/ml jedes Kulturansatzes für die FACS-Färbung verwendet. In eine FACS-Platte wurden für jeden Färbeansatz pro Well 10 µl Blocking-Reagenz und 100 µl Zellsuspension pipettiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Fc-Teil des IgG im Blocking-Reagenz reagiert mit den Fc-Rezeptoren auf den Oberflächen der Zellen und verhindert somit spätere unspezifische Reaktionen mit den Nachweisantikörpern. Nach dem Blocken wurden die direkt markierten Antikörper pipettiert und die Ansätze für weitere 40 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die FACS-Platten bei 300 g und 4 C° für 1 min zentrifugiert, die Überstände ausgeschlagen und die Zellen in jeweils 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Pellets in je 400 µl FACS-Fix in FACS-Röhrchen aufgenommen und diese bis zur Analyse maximal 24 h im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.1.2. Indirekte Färbung membranständiger Antigene

Durchführung:

Zellernte und Blocken erfolgt äquivalent der direkten FACS-Färbung. Statt fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden unmarkierte verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 40 min auf Eis wurden die FACS-Platten, wie oben aufgeführt, gewaschen, die Pellets in jeweils 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und ein markierter gegen den Primärantikörper gerichteter polyklonaler Sekundärantikörper pipettiert. Wiederum wurden die Färbeansätze für 40 min unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert. Das Waschen der FACS-Platten erfolgte wie gehabt. Danach wurden die Pellets in je 400 µl FACS-Fix in FACS-Röhrchen aufgenommen und bis zur Durchflußzytometeranalyse maximal 24 h im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.2. PKH 26-Färbung

Prinzip:

Um bei einer syngenen Zellgabe (Balb/c-KMDC-Injektion in Balb/c-Maus) die applizierten Zellen von denen des Versuchstieres, das als Chemotaxismodell dient, unterscheiden zu können, müssen erstere markiert werden. Dies geschieht mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH 26. Nach Ablauf der Migrationszeit werden die Zellen durch Peritoneallavage geerntet.

Reagenzien:

PKH 26 Kit
PBS
FCS

Durchführung:

Pro Wanderungsansatz wurden 1 x 10^7 Zellen in 150 µl Diluent des Färbekits resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl PKH 26 Stocklösung (8µ PKH 26 in 992 µl Diluent). Die Suspension wurde 5 min bei RT unter Lichtabschluss inkubiert. Danach wurde der Färbevorgang mit 300 µl FCS abgestoppt, die Zellen zentrifugiert (5 min, 300 g) und der Überstand verworfen. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, war es wichtig, zwei weitere Waschschritte mit PBS (jeweils 600 µl) durchzuführen. Danach wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und konnten nun injiziert werden.

2.2.3.3. Messung der Ca^{2+}-Freisetzung

Prinzip:

Das Calciumion ist für die Signaltransduktion bei Eukaryonten von zentraler Bedeutung. Die Funktion als intrazellulärer Botenstoff wird durch den steilen Konzentrationsgradienten zwischen Cytosol und Calciumspeicher im endoplasmatischen Retikulum ermöglicht. In der Membran dieses Kompartimentsystems befindet sich eine Ca^{2+}-ATPase, die Ca^{2+} aus dem Cytosol in das endoplasmatische Retikulum pumpt und somit den Gradienten aufrechterhält.

Die Ligation von Sieben-Helix-Rezeptoren, wie z.B. Chemokin- und Anaphylatoxinrezeptoren, bewirkt über die Aktivierung des rezeptorassoziierten G-Proteins die Ingangsetzung der Phosphoinositidsignalkaskade, die durch die Entstehung von Inositol-1,4,5-triphosphat in der Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern resultiert. Diese Freisetzung kann durch den Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffs wie dem Chelator Indo-1 nachgewiesen werden. Hierbei bindet Indo-1 das freigewordene Ca^{2+} (STRYER, 1995). Dies hat eine Änderung der Wellenlänge des Farbstoffs zur Folge, welche nachgewiesen und gemessen werden kann. Durch den Einsatz des ionophorischen Antibiotikums Ionomycin, das als effektiver Carrier für zweiwertig positive Ionen wirkt, wird ein Vergleich zwischen dem durch das eingesetzte Chemokin ausgelösten Calciumsignals und der Gesamtmenge an intrazellulärem freiem Calcium möglich. Ionomycin bewirkt einen kompletten Calciumausstrom aus den intrazellulären Calciumspeichern ins Cytoplasma.

Reagenzien:

Krebs-Ringer-Lösung
Pluronic F127 (5%)
Indo-1 (1 mM)
Medium I
Kulturmedium
Ionomycin

Durchführung:

Pro Messansatz wurden 1 x 10^6 Zellen in 500 µl Medium I benötigt. Zur Zellsuspension wurde die bereits vorbereitete Färbelösung hinzu pipettiert (200 µl Medium I; 2,8 µl 5%iges Pluronic F127; 0,7 µl 1 mM Indo-1). Unter Ausschluss von Licht erfolgte die Inkubation der Ansätze für 25 min bei 30°C im Shaker (300 rpm). Danach wurden 700 µl Kulturmedium hinzu pipettiert und die Ansätze für 10 min bei RT inkubiert. Um das nicht gebundene Indo-1 und Pluronic F127 zu entfernen, mussten die Zellen nun zweimal mit Krebs-Ringer-Lösung gewaschen werden (5 min, 300 g). Anschließend wurden die Zellen in 900 µl Krebs-Ringer-Lösung resuspendiert. Pro Messung benötigte man 400 µl der Suspension und 40 µl des Stimulus (z.B. C5a 1000 ng/ml Ausgangskonzentration ergaben in der Messung durch die

Verdünnung mit der Zellsuspension als Endkonzentration 100 ng/ml). Als Positivkontrolle wurde Ionomycin (Endkonzentration 1 µg/ml) verwendet.

2.2.3.4. Cytospin

Prinzip:

Durch die Zentrifugalbeschleunigung können Zellen gezielt auf einen Objektträger aufgebracht werden. Im Gegensatz zum Ausstrich erfolgt die Verteilung der Zellen gleichmäßig und damit wird ein reproduzierbareres Resultat erzielt.

Durchführung:

Zur Gewinnung von Cytospins wurden sialinisierte Objektträger in die Vorrichtung des Rotors (AC-060 Cytopro Rotor) der Cytospinzentrifuge eingesetzt, die Cytospinkammern eingeklemmt und 2,5 x 10^5 Zellen in die Reservoirs der Kammern überführt. Durch die Zentrifugation (300 g, 3 Minuten) wurden die Zellen aus den Reservoirs herausgeschleudert und damit auf die Objektträger aufgetragen. Nach zweistündiger Trocknung wurden die Objektträger für 10 min bei minus 20°C in bereits gekühltes Methanol gestellt. Nach der Trocknung über Nacht wurde eine Hämacolorschnellfärbung durchgeführt.

2.2.3.5. Färbung der Cytospins

Prinzip:

Um den Anteil der einzelnen Zellarten zueinander zu bestimmen, die Qualität einer Zellkultur zu überprüfen oder sich einen Überblick verschaffen zu können, färbt man einen Ausstrich oder Cytospin mit Eosin und Methylenblau. Der saure Farbstoff Eosin ist orange-rot und färbt basische Zellbestandteile wie Hämoglobin und eosinophile Granula. Methylenblau ist basisch, blau-violett und färbt saure Zellbestandteile wie basophile Granula und Nukleinsäuren. Die Hämacolorschnellfärbung beruht also auf Säure-Base-Reaktionen.

Reagenzien:

Hämacolorschnellfärbung: Eosin
Methylenblau

Durchführung:

Der bereits fixierte Objektträger mit den Zellen wurden nach dem Trocknen 5 x 1 sec in Eosin getaucht, danach die Rückwand des Objektträgers mit einem weichen Zellstofftuch abgewischt, um überschüssigen Farbstoff nicht in die nächste Lösung zu übertragen. Anschließend erfolgte die Färbung mit Methylenblau auf die gleiche Weise. Zum Schluss wurde der Objektträger vorsichtig unter fließendem Wasser von überschüssiger Farbe befreit, nach dem Lufttrocknen unter dem Mikroskop (800 bis 1000 fache Vergrößerung, Immersionsobjektiv) begutachtet und fotografiert.

2.2.3.6. Chemotaxis

Die Chemotaxis ermöglicht es dem Experimentator Rückschlüsse auf die Funktion bestimmter membranständiger Oberflächenproteine, der Rezeptoren, ziehen zu können. Das Vorkommen dieser Marker und deren Ankopplung an das intrazelluläre Signaltransduktionsnetz versetzt die Zelle in die Lage, auf Reize zu reagieren. Der Einsatz von Chemotaxinen lässt Zellen mit passendem Rezeptor in Richtung des Chemotaxinkonzentrationsgradienten wandern. Somit kann der Beweis für die Funktionalität des Rezeptors erbracht werden. Eine Chemotaxis kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden.

2.2.3.6.1. Chemotaxis *in vitro*

Reagenzien:

Chemotaxismedium
PBS
Chemotaxin (rh C5a, rh MIP-1α)
8 µm, Transwell® Permeable Supports

Durchführung:

Die Poreneinsätze mit der gewünschten Porengröße wurden in die Näpfchen einer 24-Well-Platte des Transwell® Systems platziert und anschließend 600 µl des Chemotaxismediums, welches das zu testende Chemotaxin enthielt, in die Näpfchen pipettiert. Das Chemotaxismedium der Negativkontrolle enthielt kein Chemotaxin. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Trypanblau gezählt und 1×10^6 lebende Zellen pro ml Chemotaxismedium aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden 100 µl in die Poreneinsätze pipettiert und die Transwell®-Platte. Die Platte wurde dann für die Dauer der Inkubation (1h) in den Brutschrank (37°C und 5 % CO_2) gestellt. Während dieser Zeit ist es den Zellen möglich in Richtung des Chemotaxins zu wandern, vorausgesetzt sie exprimieren den dafür passenden Rezeptor.
Im Anschluss daran wurden die Filtereinsätze einzeln entnommen, ihre Unterseite mit PBS in das zugehörige Näpfchen gespült, um daran haftende Zellen zu entfernen. Dann wurde die Platte für 30 min auf Eis gestellt, damit adhärente Zellen sich vom Untergrund ablösen und anschließend der Inhalt jedes Näpfchens in ein separates Röhrchen überführt. Die Näpfchen wurden mit kaltem PBS nachgespült und die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 300 g). Nach der Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und gezählt.

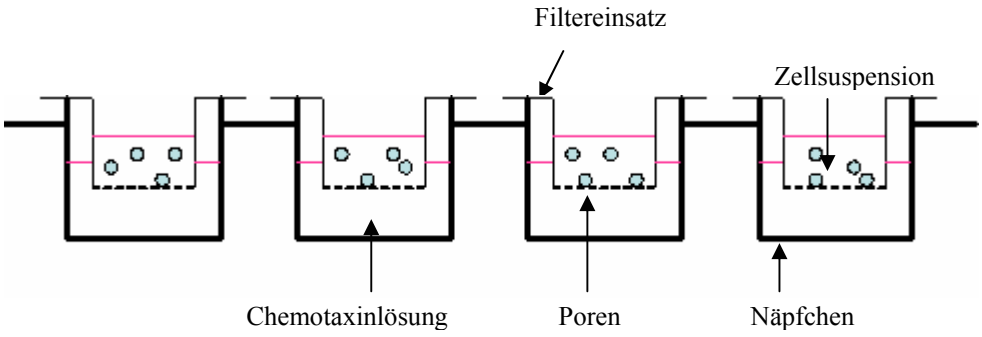


Abb. 8: Schematische Darstellung des Transwell® Systems. Beschreibung siehe Text.

2.2.3.6.2. Chemotaxis *in vivo*

Da die *in vivo* Chemotaxis ein Tierversuch ist, sind die entsprechenden Experimente mit größter Sorgfalt zu planen und durchzuführen.

Reagenzien:

Narkosecocktail: Hostaket / Rompun / PBS = 1 / 1 / 8

PBS

Zellen

Chemotaxin

Tab. 7: Einsatz von Chemotaxinen in den *in vivo* Versuchen

Chemotaxin	Rezeptor	Dauer der Wanderung		
		4 h	24 h	48 h
rh C5a	C5aR (CD88)	5, 10, 40 µg	10, 20 µg	40 µg
rh C3a	C3aR		50 µg	
rh MDC	hu CCR4		10 µg	
rh MCP-1	hu CCR2		10 µg	
rh MIP-1α	hu CCR1, hu CCR5		10 µg	10 µg
rm MCP-1	mu CCR2		10 µg	
rm MDC	mu CCR4		10 µg	
rm MIP-1α	mu CCR1, mu CCR5	10 µg	10 µg	2x10 µg
rm MIP-3α	mu CCR6		10 µg	
rm MIP-3β	mu CCR7		10 µg	
fMLP	FPR		10 µg	
LL37	nicht bekannt		10 µg	

Durchführung:

Die im Wanderungsversuch zu untersuchenden Zellen wurden geerntet, 1 x 10^7 Zellen in 250 µl PBS in einer 1-ml-Spritze, und 200 µl PBS inklusive Chemotaxin in einer anderen 1-ml-Spritze aufgenommen. Die Mäuse wurden durch die intraperitoneale Injektion von 100 µl des Narkosecocktails sediert. Die Wirkung der Narkose setzte ca. 5 bis 10 Minuten nach der Injektion ein. Während dieser Zeit sollten die Mäuse ruhig und abgedunkelt stehen. Anschließend wurden das Chemotaxin intraperitoneal (bei Kontrolltieren PBS) und die Zellsuspension intravenös in eine der vier Schwanzvenen appliziert. In Abhängigkeit des Versuchsziels sollten die Zellen entweder 4 h oder 24 h bzw. 48 h *in vivo* wandern.

2.2.3.6.3. Peritoneallavage

Reagenzien:

auf Eis gekühltes PBS

Durchführung:

Nach Ablauf der Migrationszeit/Inkubationszeit wurden die Mäuse durch CO_2 getötet, die Haut des Abdomens und das Peritoneum durch einen kleinen Schnitt perforiert. Kaltes PBS wurde in die Bauchhöhle pipettiert, vorsichtig resuspendiert, um nicht die Innereien zu verletzen, und das PBS aus der Bauchhöhle in ein Röhrchen überführt. Der Pipettiervorgang wurde so oft wiederholt, bis 7 ml PBS verbraucht waren. Die so gewonnenen Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt, gezählt und für die FACS-Färbung auf $2x10^6$ lebendige Zellen/ml in FACS-Puffer eingestellt.
Da bei der Applikation von Balb/c-Zellen in Balb/c-Tiere (Inzuchtstamm) eine PKH-Färbung vorausging, konnten die injizierten Zellen durch ihre PKH-bedingte Eigenfluoreszenz bei der FACS-Messung von denen des Tieres, in das sie appliziert wurden, unterschieden werden. Vor der Injektion von humanen Zellen in SCID-Mäuse ist eine PKH-Färbung nicht notwendig. Hier genügt es, die Lavagezellen mit spezifischen antihumanen Antikörpern zu färben, um sie im FACS-Gerät von denen des Versuchstieres differenzieren zu können.

2.3. Statistik

Für die Kalkulationen der p-Werte wurde der gepaarte Student´s T-Test angewandt.

3. ERGEBNISSE

Durch vorangegangene Studien von SORURI *et al*. (2003A) konnte IL-4 bereits als kritischer Modulator für die Expression von Anaphylatoxinrezeptoren bei Monozyten und Dendritischen Zellen (DC) und deren Wanderungsverhalten gegen die entsprechenden Liganden demonstriert werden.

Aufbauend auf diesen Versuchsergebnissen war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Migrationseigenschaften von Monozyten, Makrophagen und DC in Abhängigkeit der TH2-Cytokine IL-4 und IL-13 sowie die regulatorische Funktion von PGE_2 auf Expression und Funktion ausgewählter chemotaktischer Rezeptoren für die genannten Zellen näher zu beleuchten. Zu diesem Zweck wurde auf humanen Makrophagen, DC und Monozyten und auf murinen Makrophagen und DC die Menge ausgewählter Chemotaxinrezeptoren anhand der FACS-Analyse bestimmt. Da die Ermittlung der Rezeptorexpression allein keine Aussage über die biologische Wirkungsweise zulässt, war es unumgänglich, die biologische Funktionalität der betreffenden Rezeptoren in einem *in vivo* Migrationsmodell im Maussystem zu untersuchen. Ergänzend ermöglichten Versuche mit Knockout-Mäusen und mit Signaltransduktionsinhibitoren tiefere zusätzliche Einblicke in die Materie.

3.1. Rezeptorexpression und Chemotaxis im murinen System

3.1.1. Der Einfluss von IL-4 und IL-13 auf Anaphylatoxinrezeptoren im murinen System

SORURI *et al*. (2003A) konnten zeigen, dass IL-4 die mRNA-Expression des C5aR in murinen aus Knochenmark generierten DC herunterreguliert und deren C5a-induzierte Mobilisierung hemmt. Murine Makrophagen und DC wurden aus hämatopoetischen Knochenmarksvorläuferzellen mit M-CSF bzw. GM-CSF mit und ohne IL-4 bzw. IL-13 generiert. Die Anaphylatoxinrezeptorexpression wurde mittels indirekter FACS-Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt. Für *in vivo* Migrationstudien wurden Makrophagen und DC aus Balb/c mit PKH26 gefärbt, i.v. in syngene Balb/c-Mäuse appliziert und C5a (10µg) oder C3a (50µg) i.p. injiziert. Nach 15-18 h wurden die Peritonealzellen durch Lavage geerntet und die PKH26-gefärbten gewanderten Zellen per FACS-Analyse identifiziert. Durch die Verwendung von Balb/c- und C57/BL6-Mäusen, zwei Mausstämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund, wurde sichergestellt, dass die Versuchsergebnisse nicht durch die genetischen Besonderheiten eines Inzuchtstammes

determiniert sind, sondern einzig und allein auf die Wirkungsweise der verwendeten Mediatoren zurückzuführen waren und damit als repräsentativ angesehen werden können.

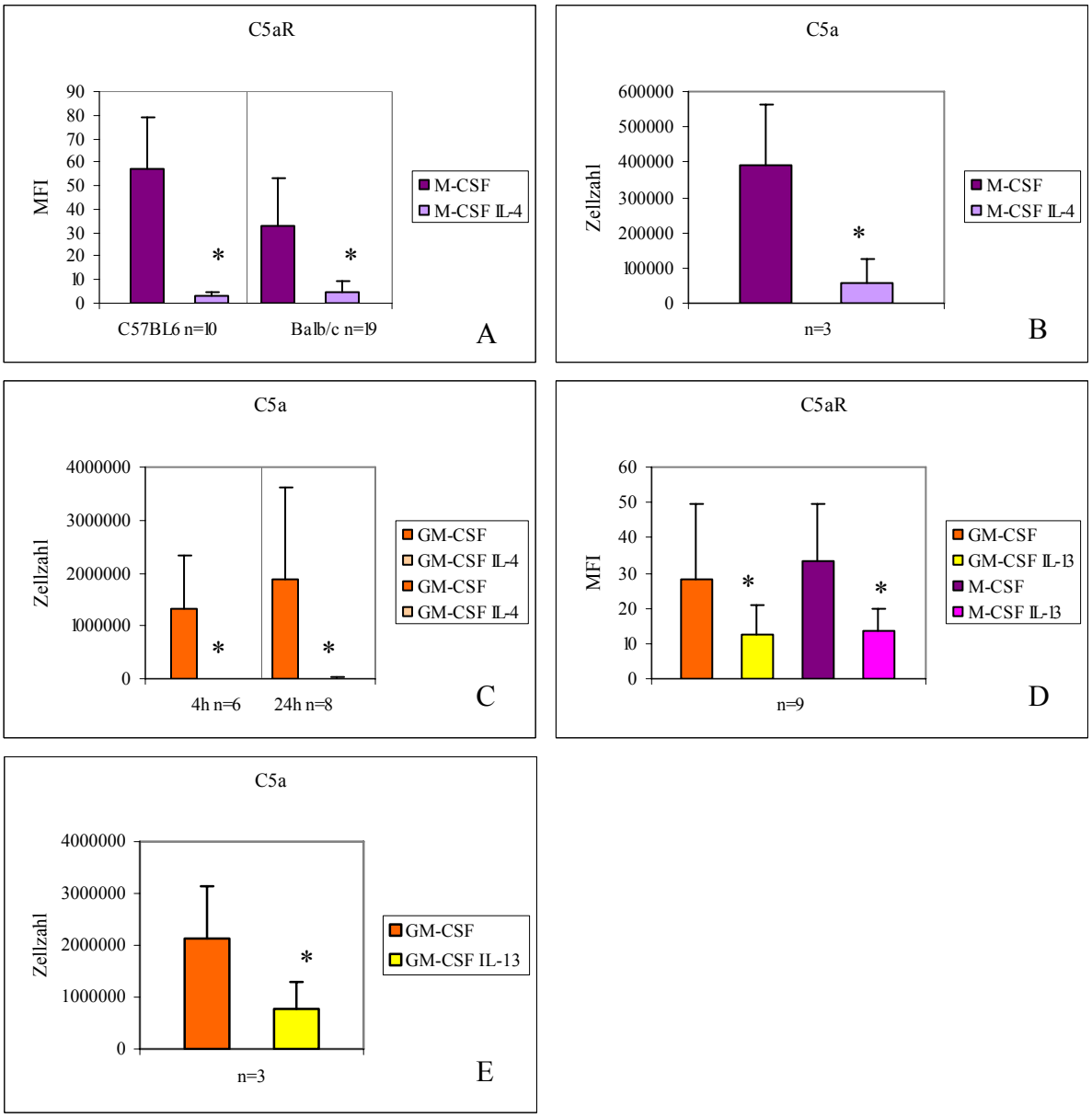


Abb. 9: IL-4 und IL-13 beeinträchtigen Expression und Funktion von Anaphylatoxinrezeptoren auf murinen DC und Makrophagen. (A) C5aR-Expression auf Makrophagen, die mit und ohne IL-4 kultiviert wurden, von C57/BL6- (n=10) und Balb/c-Mäusen (n=19). (B) *In vivo* Migration dieser Zellen gegen C5a (n=3). (C) *In vivo* Migration von DC gegen C5a (4 h n=6, 24 h n=8). (D) C5aR-Expression auf DC und Makrophagen (jeweils n=9), die mit und ohne IL-13 kultiviert wurden. (E) *In vivo* Migration der DC gegen C5a (n=3). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. $*p<0,05$

In Abbildung 9A ist zu sehen, dass Makrophagen aus Balb/c und aus C57/BL6-Mäusen den C5aR auf ihrer Oberfläche als Folge des Einflusses von IL-4 herunterregulierten. Die Abnahme der C5aR-Menge korrelierte mit einer verminderten Wanderungsfähigkeit der Zellen *in vivo* in Richtung eines C5a-Konzentrationsgradienten (Abb. 9B). Eine

beeinträchtigte Migration im Versuchstier konnte auch für DC nachgewiesen werden (Abb. 9C). Wie in den Abbildungen 9D und 9E zu erkennen ist, stellt auch das mit IL-4 verwandte TH2-Cytokin IL-13 einen Inhibitor der C5aR-Expression und -Funktion in murinen DC und Makrophagen dar.

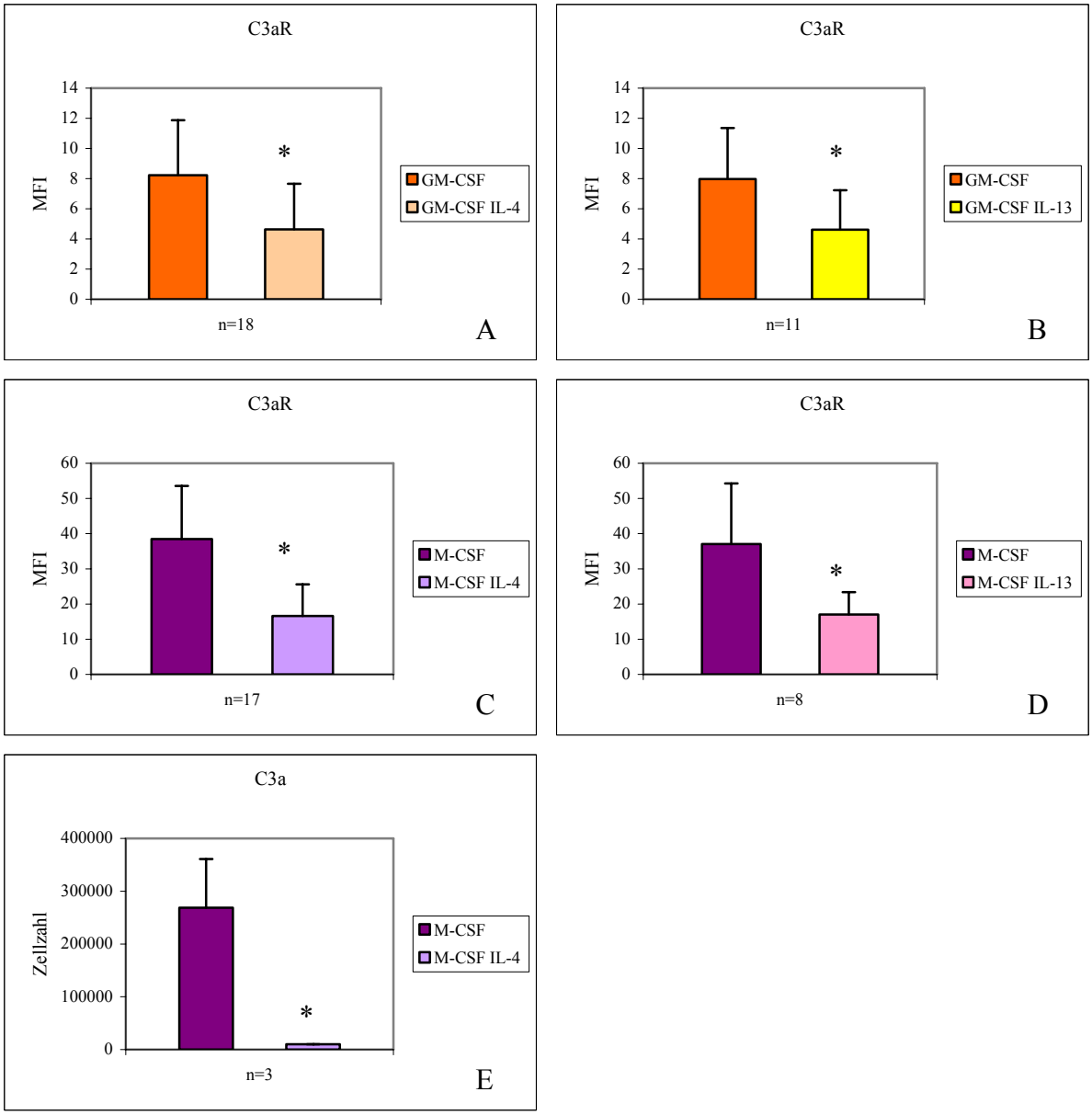


Abb. 10: IL-4 und IL-13 beeinträchtigen Expression und Funktion von Anaphylatoxinrezeptoren auf murinen DC und Makrophagen. (A) C3aR-Expression auf DC, die mit und ohne IL-4 (n=18) bzw. (B) mit und ohne IL-13 (n=11) kultiviert wurden und (C) auf Makrophagen, die mit und ohne IL-4 (n=17) bzw. (D) mit und ohne IL-13 (n=8) kultiviert wurden. (E) *In vivo* Migration der Makrophagen gegen C3a (n=3). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

Die Expression des Oberflächenproteins C3aR auf Makrophagen wurde ebenso wie die C5aR-Expression durch den Einfluss von IL-4 bzw. IL-13 gehemmt (Abb. 10C, 10D). Parallel dazu führte die Kultivierung mit IL-4 zu einer starken Beeinträchtigung der

Wanderungsfähigkeit der Makrophagen gegen C3a *in vivo* (Abb. 10E). Die Expression von C3aR auf DC, die aus hämatopoetischen Knochenmarkszellen generiert wurden, war äußerst niedrig im Vergleich zu der auf Makrophagen (Abb. 10A, 10B). Aus diesem Grund wurden die Makrophagen für die *in vivo* Versuche ausgewählt, da hier eher die Möglichkeit bestand einen Effekt beobachten zu können.

3.1.2. Die *in vivo* Migration gegen einen Liganden ist zeit- und dosisabhängig

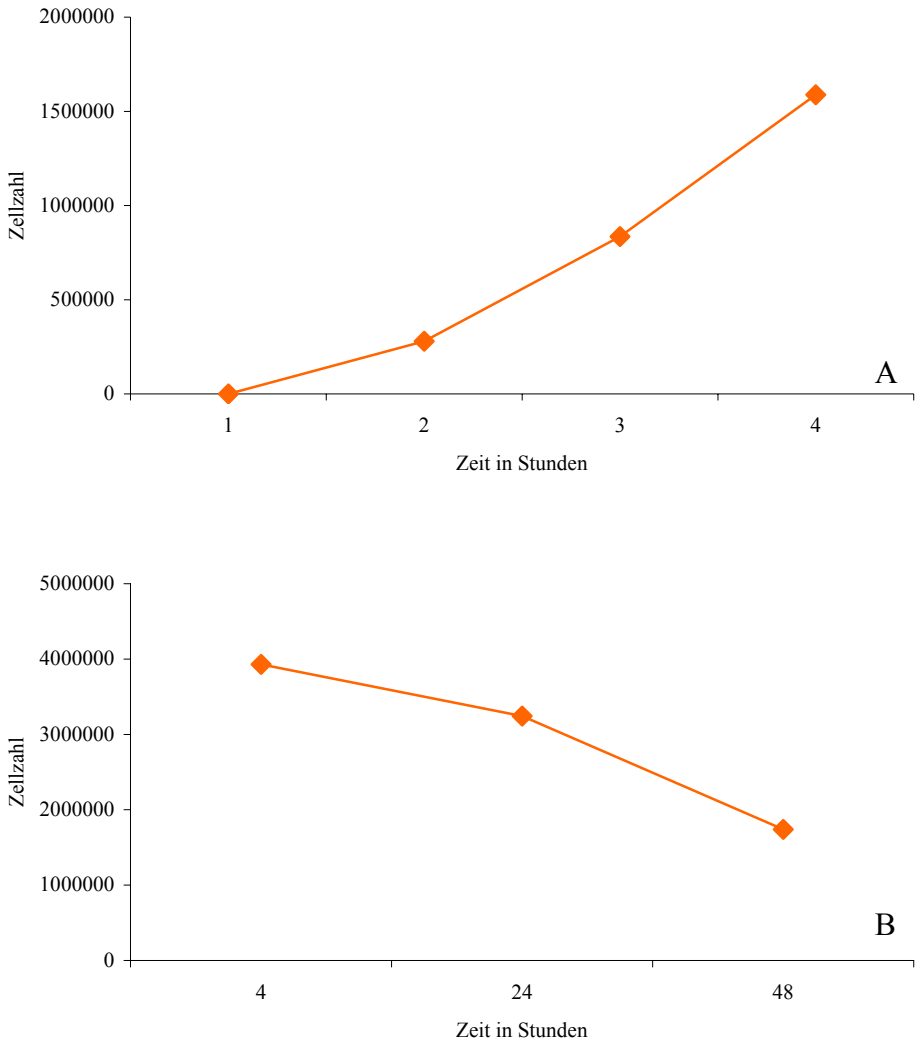


Abb. 11: Die Wanderung von GM-CSF kultivierten murinen DC gegen C5a *in vivo* ist zeitabhängig und spezifisch. PKH26-markierte KMDC wurden i.v. injiziert, C5a 10 µg i.p. Peritonealzellen wurden geerntet nach 1 h, 2 h, 3 h oder 4 h und (B) nach 4 h, 24 h oder 48 h.

PKH26-markierte murine DC, die mit GM-CSF kultiviert wurden, wanderten *in vivo* zeitabhängig gegen C5a in das Peritoneum ein. Die peritoneale Ansammlung dieser Zellen

konnte bereits zwei Stunden nach Injektion beobachtet werden und war noch nach 48 Stunden nachweisbar (Abb. 11A, 11B).

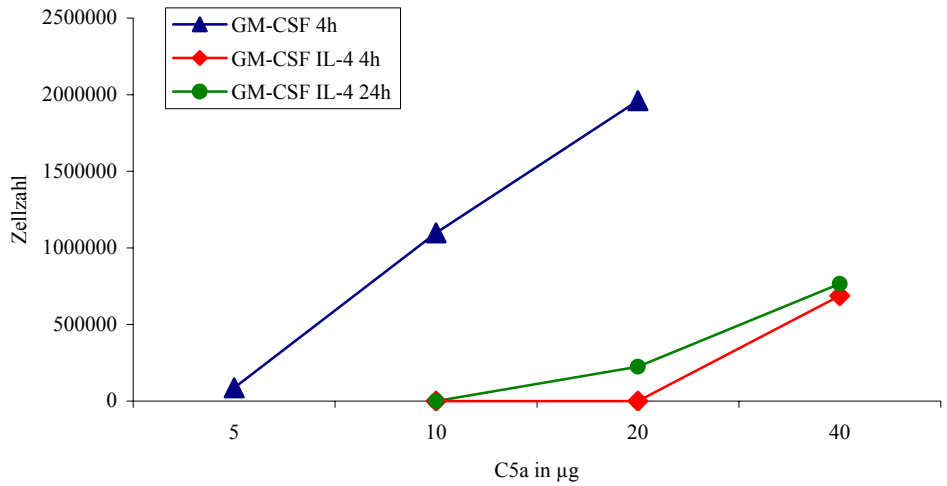


Abb. 12: Größere Mengen an C5a überwinden die IL-4 induzierte Unempfänglichkeit bei murinen DC, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden. DC wurden mit PKH26 markiert, i.v. injiziert, variierende Mengen an C5a i.p. appliziert. Peritonealzellen wurden nach 4 h oder 24 h geerntet.

Um herauszufinden, ob höhere Dosen an C5a den hemmenden Einfluss von IL-4 auf die Wanderungseigenschaften von Zellen überwinden können, wurden zusätzlich *in vivo* Migrationsversuche mit 20 µg und 40 µg C5a durchgeführt. Abbildung 12 demonstriert, dass diese größeren C5a-Mengen tatsächlich zu einer gesteigerten Migration von mit IL-4 kultivierten murinen DC führten. Damit DC bereits nach vier Stunden in den Peritonealraum einwandern, war eine Gabe von 40 µg C5a nötig. Für eine 24-h-Wanderung reichten 20 µg C5a aus. Im Gegensatz dazu waren für Zellen, die nur mit GM-CSF kultiviert wurden, nur 5 µg nötig, um sie in einem Zeitraum von vier Stunden ins Peritoneum einwandern zu lassen. Eine *in vivo* Migration wurde nur beobachtet bei gleichzeitiger Applikation von Zellen i.v. und C5a i.p.. Bei Kontrolltieren, denen anstelle von C5a PBS injiziert wurde, fand keine Zellwanderung statt. Durch diese Beobachtung konnte eine Spontanmigration in die Bauchhöhle ausgeschlossen werden.

3.1.3. Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT6 in der Expression von Anaphylatoxinrezeptoren

Knockout-Mäuse bieten die Möglichkeit, die Bedeutung von Proteinen für bestimmte physiologische Prozesse zu erkennen. Durch die Abwesenheit des Transkriptionsfaktors

STAT6 in Zellen aus STAT6-/- Mäusen kann IL-4 seiner biologischen Funktion nicht gerecht werden, da das durch dieses Cytokin gegebene Signal seinen Bestimmungsort nicht erreicht. Der Einfluss von IL-4 bleibt damit vollständig wirkungslos.

In Abbildung 13A wird die Expression des C5a-Rezeptors auf DC und Makrophagen und in Abbildung 13B die des C3a-Rezeptors auf Makrophagen gezeigt. In der Expression der Anaphylatoxinrezeptoren besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen die mit und ohne IL-4 kultiviert wurden. Dies demonstriert die dominante Rolle von STAT6 in der IL-4-induzierten Expressionsverringerung der chemotaktischen Rezeptoren für C5a und C3a auf DC und Makrophagen.

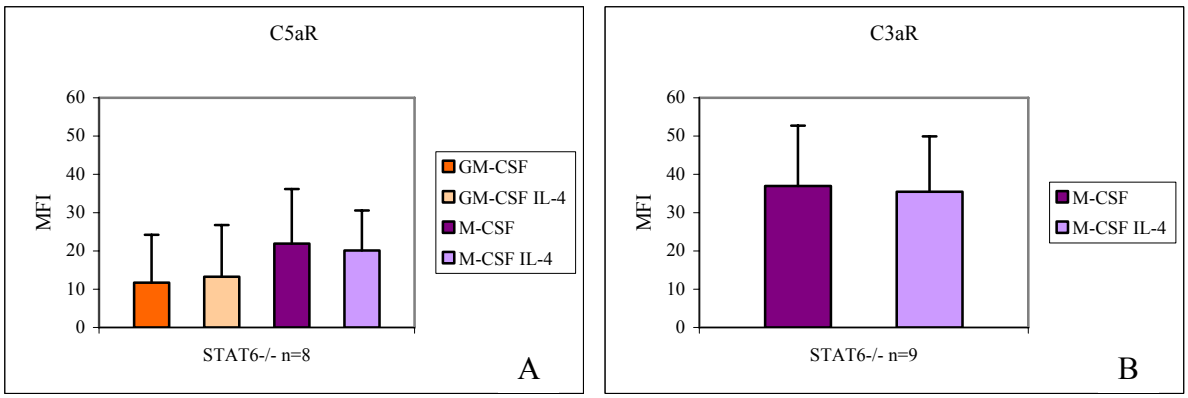


Abb. 13: Anaphylatoxinrezeptorexpression auf DC und Makrophagen in STAT6 defizienten Mäusen. Die Zellen wurden mit und ohne IL-4 kultiviert. (A) C5aR-Expression auf DC und Makrophagen. (B) C3aR-Expression auf Makrophagen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben.

3.1.4. Einsatz von Inhibitoren zur Klärung der Beteiligung von Signalmolekülen

Der Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren eröffnete die Möglichkeit PI3K als Teil der Signaltransduktionskaskade, die an der IL-4-induzierten Signalgebung beteiligt ist, zu identifizieren. LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-eins) ist ein zellpermeabler, potenter und spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3-Kinasen). Seine Wirkung entfaltet dieser an der ATP-Bindestelle des Enzyms (Calbiochem Produktinformation). Um die Beteiligung weiterer Kinasen an der Regulation des C5aR festzustellen, wurden außerdem SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol), JNK Inhibitor II (SP600125; anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-eins; 1,9-pyrazoloanthron) und PD98059 (2´-Amino-3´-methoxyflavon) verwendet. SB203580 ist ein MAP Kinase Inhibitor, JNK Inhibitor II ein selektiver und reversibler Inhibitor der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK-1, JNK-2, JNK-3). Die Hemmung der Phosphorylierung von JNK

ist kompetetiv mit ATP. PD98059 unterdrückt selektiv die Aktivierung der MAP Kinase Kinase (MEK) und dadurch die davon abhängige Phosphorylierung des MAP Kinase Substrates (Calbiochem Produktinformation).

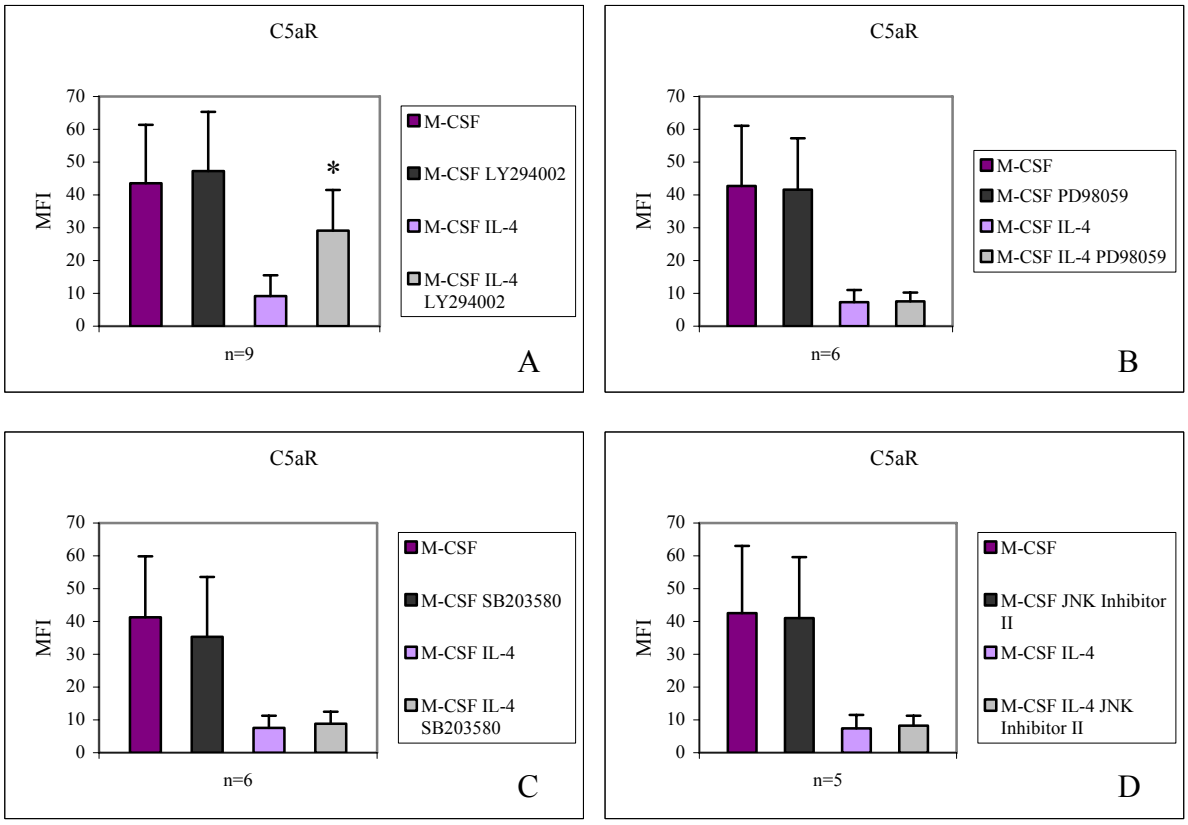


Abb. 14: C5aR-Expression auf Makrophagen, die nach 5 Tagen mit und ohne IL-4 für 48 h unter Zusatz von Inhibitoren für Signaltransduktionsmoleküle oder ohne diese kultiviert wurden. Zugabe der Inhibitoren für (A) PI3K (LY294002) (n=9), (B) ERK (PD098059) (n=6), (C) MAPK p38 (SB203580) (n=6) oder (D) JNK (JNK Inhibitor II=SP600125) (n=5). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. $*p<0,05$

Nur unter Verwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 konnte eine Beeinträchtigung der Expression des C5aR, der hierbei als Indikatorprotein für den IL-4-Effekt diente, gezeigt werden (Abb. 14A). Dies impliziert eine Beteiligung von PI3K an der IL-4-abhängigen intrazellulären Signalübertragung. Da die anderen Inhibitoren keinerlei Wirkung auf die C5aR-Expression ausübten, können die von ihnen inhibierten Proteine nicht in der IL-4 abhängigen Signaltransduktion involviert sein (Abb. 14B, 14C, 14D). Vergleicht man die C5aR-Expressionen der M-CSF-Zellen und M-CSF/IL-4/LY294002-Zellen miteinander so erkennt man eine unvollständige Hemmung des IL-4-Effektes. Trotz des PI3K-Inhibitors erfolgt eine leichte Herunterregulierung des C5aR durch IL-4. Erklärt werden könnte dies durch die PI3K Klasse II Isoenzyme PI3K-C2α, PI3K-C2β und PI3K-C2γ. Ein Merkmal dieser Enzyme ist ihre Unempfindlichkeit gegenüber PI3K Inhibitoren mit einer ausgeprägten

Resistenz von PI3K-C2α gegen LY294002 und Wortmannin. Vieles in der Aktivierung der Klasse II PI3K ist noch nicht geklärt, aber ihre Beteiligung an diversen Signalwegen ist unumstritten. Es ist bekannt, das Insulin PI3K-C2α in Adipozyten und Muskelzellen aktiviert. So könnte man spekulieren, ob durch die Aktivierung des IRS-1/2 Signals infolge der Stimulation der IL-4Rα-Kette neben der PI3K der Klasse I nicht auch PI3K-C2α aktiviert werden könnte. FALASCA *et al*. (2007) konnten nachweisen, dass die Signaltransduktion über PI3K-C2α ausgelöst durch Insulin unabhängig von anderen PI3K Isoenzymen fungiert.

3.1.5. Einfluss von IL-4 und IL-13 auf Chemokinrezeptoren im murinen System

Zusätzlich zu den Anaphylatoxinrezeptoren war in dieser Studie auch der Einfluss von IL-4 und IL-13 auf ausgesuchte Chemokinrezeptoren von Interesse. Murine Makrophagen und DC wurden aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks mit M-CSF bzw. GM-CSF mit und ohne IL-4 bzw. IL-13 generiert. Die Bestimmung der Chemokinrezeptorexpression erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender FACS-Analyse. Für die *in vivo* Wanderungsversuche wurden Makrophagen und DC mit PKH26 gefärbt und i.v. in eine der vier Schwanzvenen in syngene Balb/c-Mäuse appliziert und die Chemokine (10µg) i.p. injiziert, d.h. die Migrationsstudien wurden nur in Balb/c-Mäusen und nicht in C57/BL6-Mäusen durchgeführt. Nach 4 h bzw. 15-18 h wurden die Peritonealzellen geerntet und die PKH26-gefärbten gewanderten Zellen per FACS-Analyse identifiziert.
Die murinen CC-Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 standen im Mittelpunkt des Interesses. CCR5 reagierte sensitiv auf beide TH2-Cytokine. Die Abbildung 15A zeigt, dass IL-4 CCR5 auf DC, die aus hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Balb/c- und C57/BL6-Mäusen generiert wurden, herunterreguliert. Damit ging eine verminderte Ansprechbarkeit der Zellen gegen den CCR5-Liganden MIP-1α *in vivo* einher (Abb. 15B). Für Makrophagen, die unter M-CSF kultiviert wurden und ebenfalls von Knochenmarksvorläuferzellen aus Balb/c-Mäusen abstammten, wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Abb. 15C, 15D). Zusätzlich regulierte IL-13 die Anzahl von CCR5 in geringerem Maße als IL-4 herunter (Abb. 15E). Dies wurde parallel von einer signifikanten Hemmung der MIP-1α induzierten Migration *in vivo* begleitet (Abb. 15F).

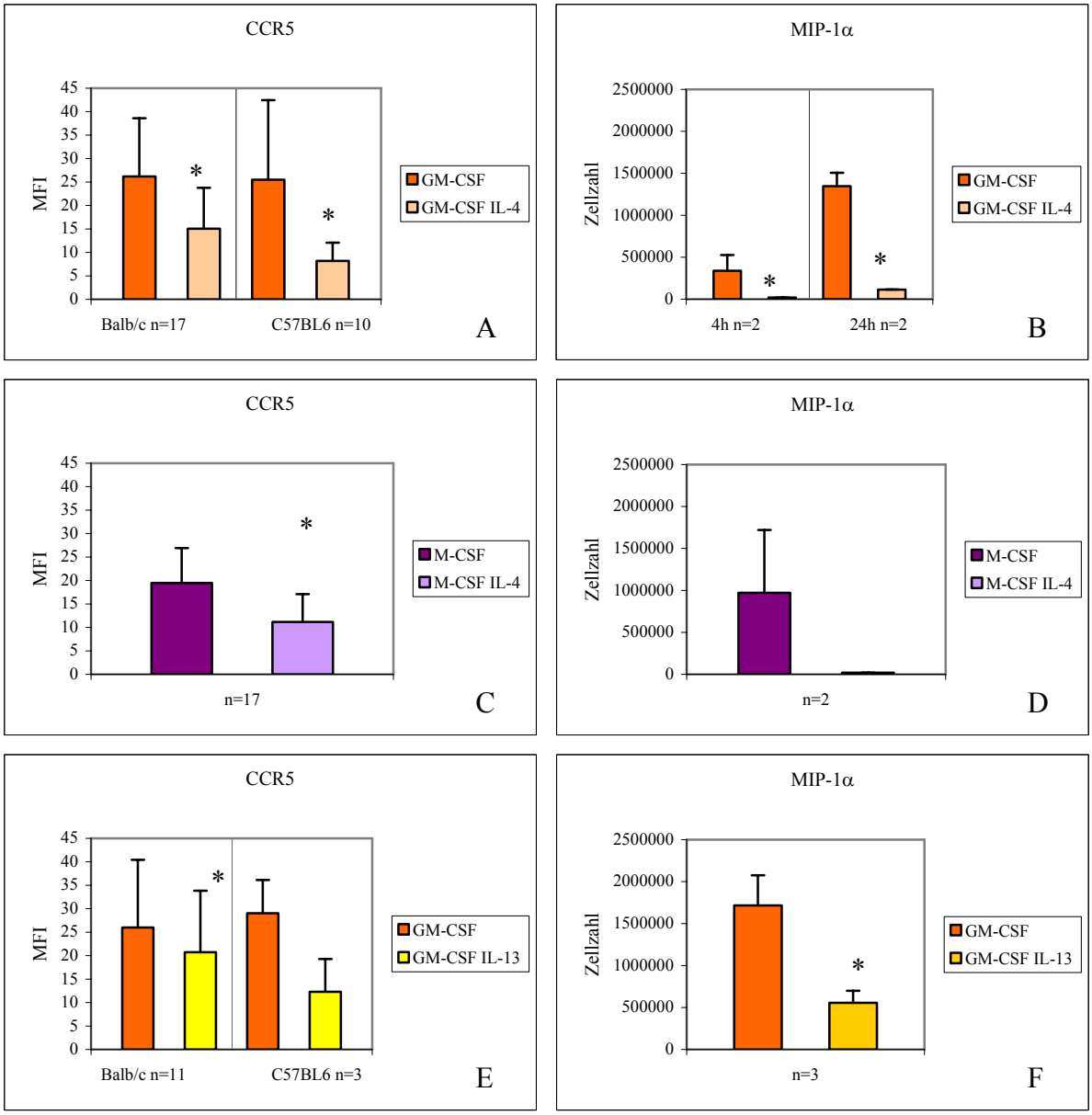


Abb. 15: IL-4 und IL-13 beeinträchtigen Expression und Funktion von Chemokinerezeptoren auf murinen DC und Makrophagen. (A) CCR5-Expression auf DC von Balb/c- (n=17) und C57/BL6-Mäusen (n=10) mit oder ohne IL-4. (B) *In vivo* Migration der DC gegen murines MIP-1α (jeweils n=2 für 4 h und 15-18 h). (C) CCR5-Expression auf Makrophagen (n=17), die mit und ohne IL-4 kultiviert wurden. (D) *In vivo* Migration von Makrophagen gegen murines MIP-1α (n=2). (E) CCR5-Expression auf DC, die mit und ohne IL-13 kultiviert wurden, von Balb/c- (n=11) und C57/B6-Mäusen (n=3). (F) *In vivo* Migration der DC gegen murines MIP-1α (n=3). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

Neben CCR5 wurde ebenfalls die Expression und Funktionalität von CCR2 untersucht. Wie in Abbildung 16A zu sehen ist, regulierte IL-4 die Menge an CCR2 auf der Zelloberfläche von aus hämatopoetischen Vorläuferzellen generierten DC aus Balb/c- und C57/BL6 Mäusen herunter. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigten die Zellen eine verminderte Fähigkeit, *in vivo* in Richtung des CCR2-Liganden MCP-1 zu wandern (Abb. 16B). In

Abbildung 16C und 16D werden ähnliche Ergebnisse für die mit M-CSF generierten murinen Makrophagen gezeigt.

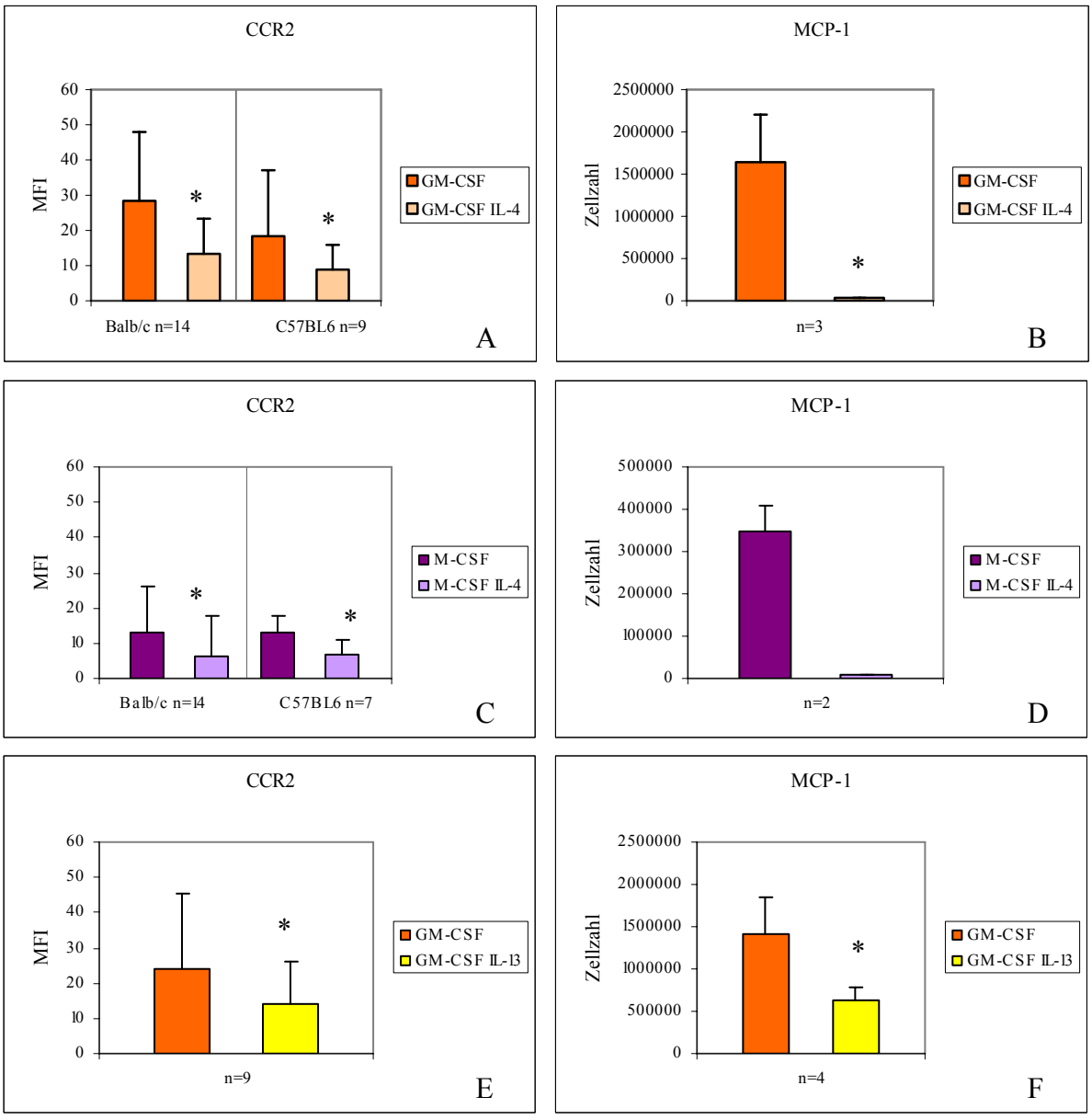


Abb. 16: IL-4 und IL-13 beeinträchtigen Expression und Funktion von Chemokinrezeptoren auf murinen DC und Makrophagen. (A) CCR2-Expression auf DC, die mit und ohne IL-4 kultiviert wurden, von Balb/c- (n=14) und C57/B6-Mäusen (n=9). (B) *In vivo* Migration der DC gegen murines MCP-1 (n=3). (C) CCR2-Expression auf Makrophagen, die mit und ohne IL-4 kultiviert wurden, von Balb/c- (n=14) und C57/BL6-Mäusen (n=7). (D) *In vivo* Migration der Makrophagen gegen murines MCP-1 (n=2). (E) CCR2-Expression auf DC (n=9), die mit und ohne IL-13 kultiviert wurden. (F) *In vivo* Migration der DC gegen murines MCP-1 (n=4). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

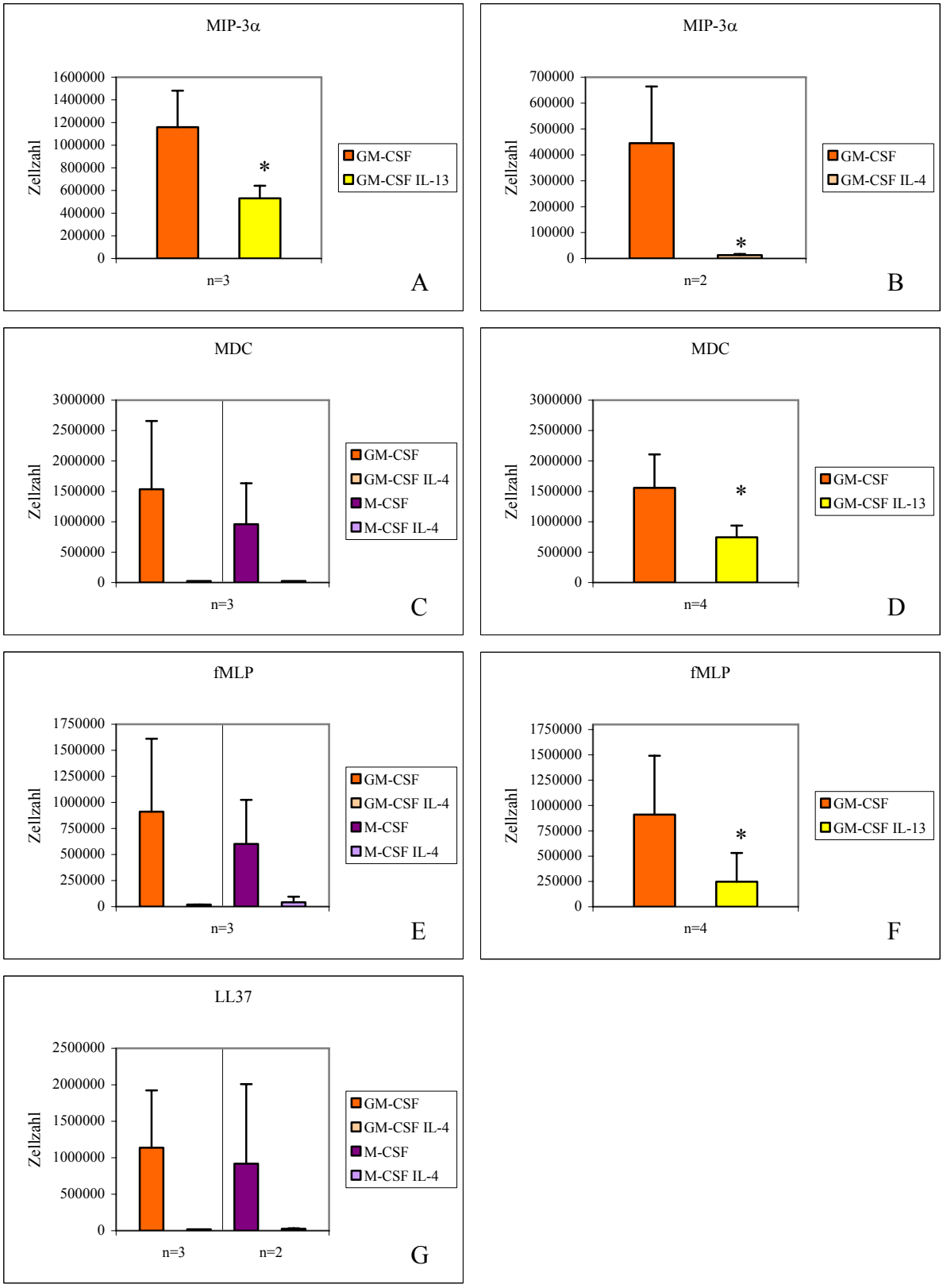


Abb. 17: IL-4 und IL-13 beeinträchtigen die Migration von murinen DC und Makrophagen gegen verschiedene inflammatorische Stimuli. (A) *In vivo* Migration von DC, kultiviert mit und ohne IL-13 (n=3), bzw. (B) mit und ohne IL-4 (n=2), gegen murines MIP-3α. (C) *In vivo* Migration von DC und Makrophagen, kultiviert mit und ohne IL-4 (jeweils n=3), gegen murines MDC. (D) *In vivo* Migration von DC, kultiviert mit und ohne IL-13 (n=4), gegen murines MDC. (E) *In vivo* Migration von DC und Makrophagen (jeweils n=3), kultiviert mit und ohne IL-4, gegen fMLP. (F) *In vivo* Migration von DC, kultiviert mit und ohne IL-13 (n=4), gegen fMLP. (G) *In vivo* Migration von DC (n=3) und Makrophagen (n=2), kultiviert mit und ohne IL-4, gegen LL-37. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

IL-13 verringerte ebenfalls die Menge von CCR2 auf der Zellobefläche (Abb. 16E) und hemmte die MCP-1-induzierte *in vivo* Chemotaxis (Abb. 16F). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-4 und IL-13 die Ansprechbarkeit von murinen DC und Makrophagen auf MIP-3α, welches der einzig bekannte Ligand für den Chemokinrezeptor CCR6 darstellt, verringern (Abb. 17A, 17B) (SORURI, *et al*., 2007).

Dies traf auch für das Chemokin MDC, das an den Chemokinrezeptor CCR4 bindet, zu (Abb. 17C, 17D). Außerdem mobilisiert fMLP, ein N-formyl Peptid bakteriellen Ursprungs mit potenter chemotaktischer Aktivität, DC und Makrophagen mit auffallend niedrigerer Effizienz, wenn die Zellen mit IL-4 oder IL-13 kultiviert wurden (Abb. 17E, 17F). Ähnliches konnte auch für das antimikrobielle Peptid LL-37 gezeigt werden (Abb. 17G). Die Peptide fMLP und LL-37 binden ebenfalls wie Anaphylatoxine und Chemokine an G-Proteingekoppelte Rezeptoren (Serpentinrezeptoren) (LE *et al*., 2002).

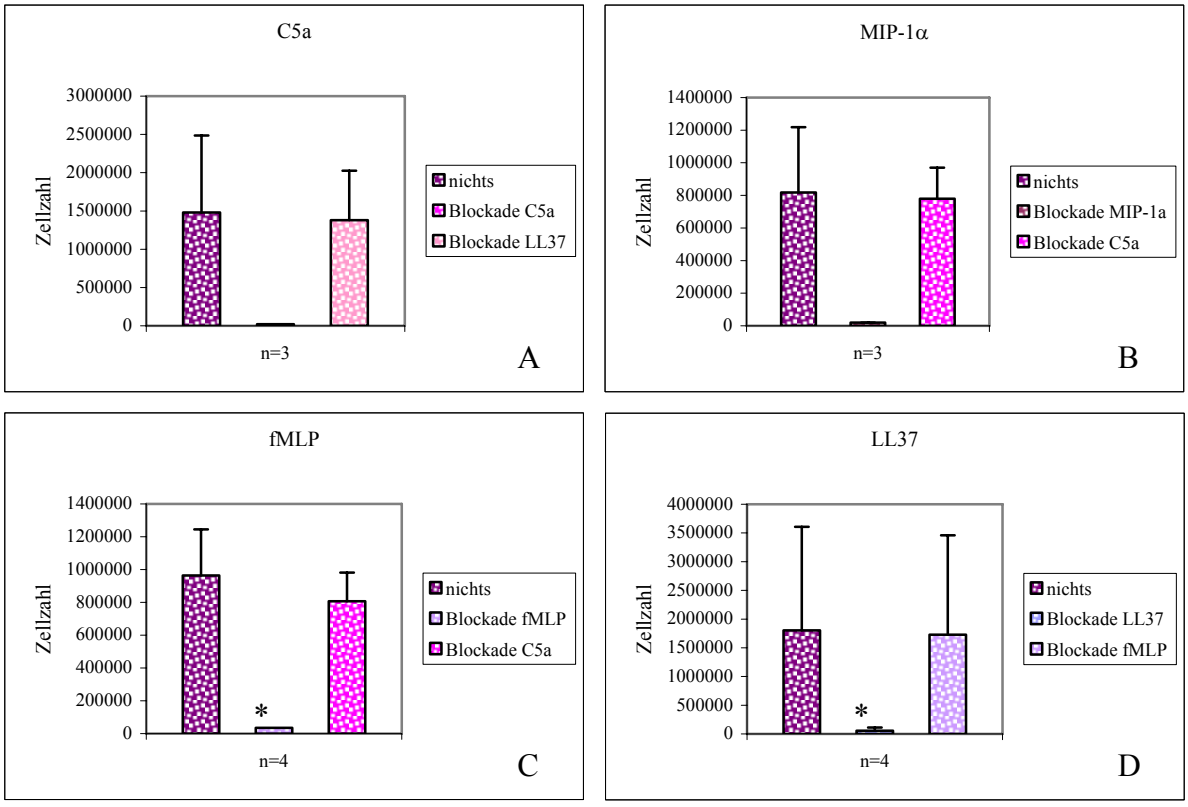


Abb. 18: Blockade durch Präinkubation bei murinen DC mit den angegebenen Chemotaxinen. Negativkontrollen mit PBS (∅). (A) *In vivo* Migration gegen C5a (n=3), (B) murines MIP-1α (n=3), (C) fMLP (n=4), und (D) LL-37 (n=4). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

Um die Beteiligung der entsprechenden Rezeptoren an der beobachteten Zellrekrutierung in den *in vivo* Migrationsversuchen beweisen zu können, wurde die Tatsache genutzt, dass G-Proteingekoppelte Rezeptoren nach Liganden-Rezeptor-Interaktion internalisiert werden

(LEFKOWITZ, 1998). Murine Makrophagen und DC wurden auch für diese Versuche aus hämatopoetischen Knochenmarksvorläuferzellen mit M-CSF bzw. GM-CSF mit und ohne IL-4 bzw. IL-13 generiert, mit PKH26 gefärbt, i.v. in syngene Balb/c-Mäuse appliziert und die Chemotaxine (10 µg MIP-3α oder MDC, 20 µg LL-37, 50 µg fMLP) i.p. injiziert. Nach 15-18 h wurden die Peritonealzellen geerntet und die PKH26-gefärbten gewanderten Zellen per FACS-Analyse identifiziert.

SORURI *et al*. (2003A) konnten zeigen, dass eine Präinkubation von Monozyten bzw. Makrophagen mit C3a die C3a-induzierte *in vivo* Migration vollständig blockieren kann, nicht aber die von C5a und umgekehrt. Die vorliegende Studie zeigt, dass die Chemotaxis von murinen DC in Richtung C5a, MIP-3α, fMLP oder LL-37 ligandenspezifisch ist, da die Wanderung durch Präinkubation der Zellen mit dem homologen Liganden unterbunden wurde (Abb. 18A, 18B, 18C, 18D). Im Gegensatz dazu gab es keinen hemmenden Effekt bei der Verwendung eines heterologen Liganden. Diese Experimente unterstreichen die *in vivo* Bedeutung und die rezeptorspezifische Natur der beobachteten *in vivo* Chemotaxis.

3.1.6. Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT6 in der Expression von Chemokinrezeptoren

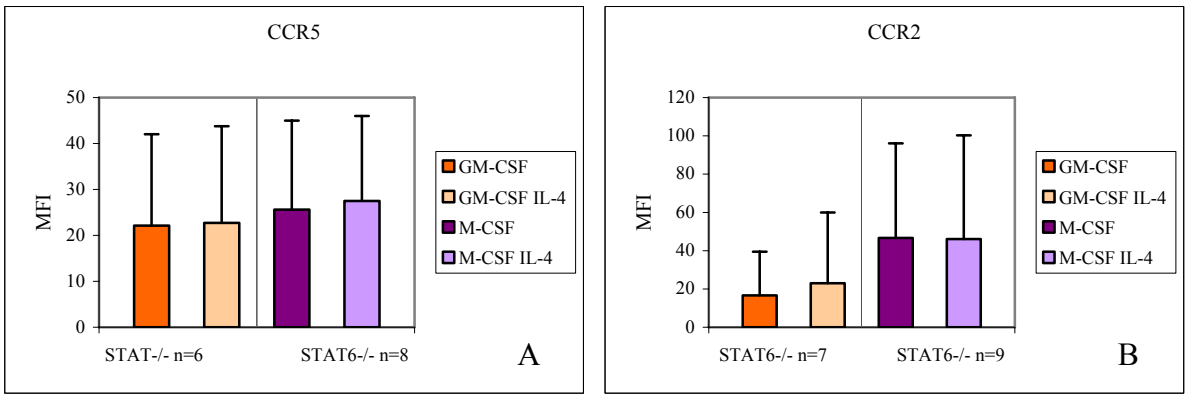


Abb. 19: Chemokinrezeptorexpression auf DC und Makrophagen in STAT6-defizienten Mäusen. (A) Expression von CCR5 auf DC (n=7) und Makrophagen (n=10). (B) Expression von CCR2 auf DC (n=7) und Makrophagen (n=9). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

Ähnlich wie bei den Anaphylatoxinrezeptoren erwies sich STAT6 als unverzichtbar für die IL-4-induzierte Herunterregulierung der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 auf murinen DC und Makrophagen. Auch hierbei wurde durch die Untersuchung dieser Zellen aus STAT6-/- Mäusen dieses Signalmolekül als essentiell für die Rezeptorregulierung durch IL-4

dentifiziert (Abb. 19A, 19B). In der Expression der Chemokinrezeptoren bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen die mit und ohne IL-4 kultiviert wurden.

3.1.7. Einfluss von IL-4 auf den Calciuminflux von murinen DC

Zu den Reaktionen, die eine Zelle nach der Ligierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch einen Agonsiten zeigt, gehört die intrazelluläre Ca^{2+}-Freisetzung. Sie wird unabhängig von anderen Signalwegen über die Aktivierung der Phospholipase C in Gang gesetzt. In der vorliegenden Studie sollte nicht nur der Zusammenhang zwischen IL-4-Wirkung und Migrationskapazität der Zellen dargelegt, sondern auch die Abhängigkeit der Ca^{2+}-Freisetzung von der IL-4-induzierten Rezeptormodulation untersucht werden. In den Abbildungen 20A, 20B und 20C sind die Reaktionsverläufe der Ca^{2+}-Freisetzung in Abhängigkeit verschiedener Mediatoren in murinen DC, die mit und ohne IL-4 kultiviert wurden, dargestellt. Die Verringerung der Ca^{2+}-Freisetzung war bei den Zellen, die dem Einfluss von IL-4 ausgesetzt waren, zu beobachten. Dieses Resultat korreliert mit der niedrigeren Expression und der beeinträchtigten *in vivo* Migration in Abhängigkeit der involvierten Rezeptoren C5aR, CCR5 und CCR2. Alle Ca^{2+}-Messungen waren signifikant (Abb. 21A, 21B, 21C). Die Zeitpunkte der Stimuluszugabe sind durch Pfeile (Chemotaxinzugabe nach 20 sec, Ionomycinzugabe nach 4 min) gekennzeichnet. Der Messzeitraum betrug 5 min. Das ionophorische Antibiotikum Ionomycin bewirkte den Ausstrom des gesamten Calciums aus den intrazellulären Speichern ins Cytoplasma und ermöglicht so einen zuverlässigen Vergleich zum Calciumsignal der eingesetzten Mediatoren C5a, MIP-1α und MCP-1.

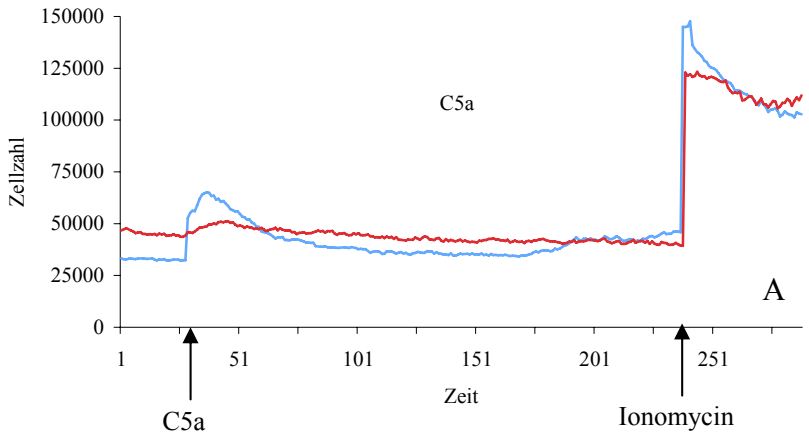


Abb. 20A: Reaktionsverlauf Calciummessung gegen C5a von KMDC aus Balb/c-Mäusen nach sieben Tagen Kultivierung mit GM-CSF (blau) und GM-CSF/IL-4 (rot). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=4.

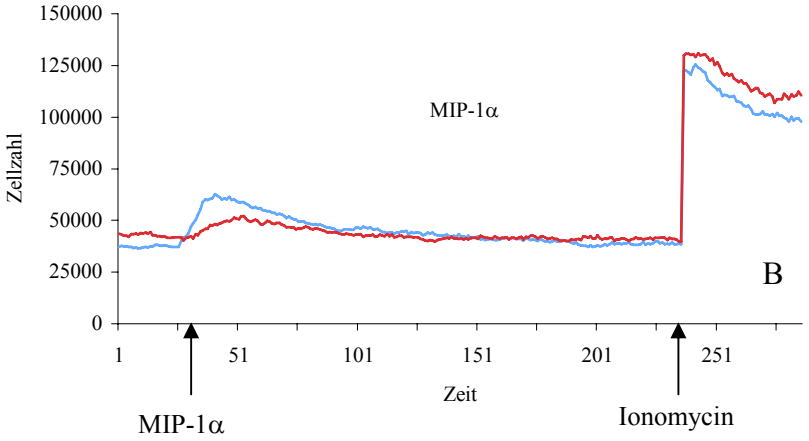


Abb. 20B: Reaktionsverlauf Calciummessung gegen MIP-1α von KMDC aus Balb/c-Mäusen nach sieben Tagen Kultivierung mit GM-CSF (blau) und GM-CSF/IL-4 (rot). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=3.

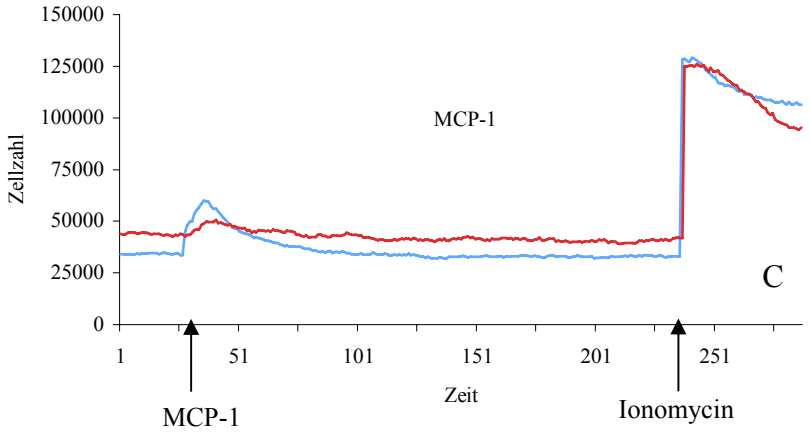


Abb. 20C: Reaktionsverlauf Calciummessung gegen MCP-1 von KMDC aus Balb/c-Mäusen nach sieben Tagen Kultivierung mit GM-CSF (blau) und GM-CSF/IL-4 (rot). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=5.

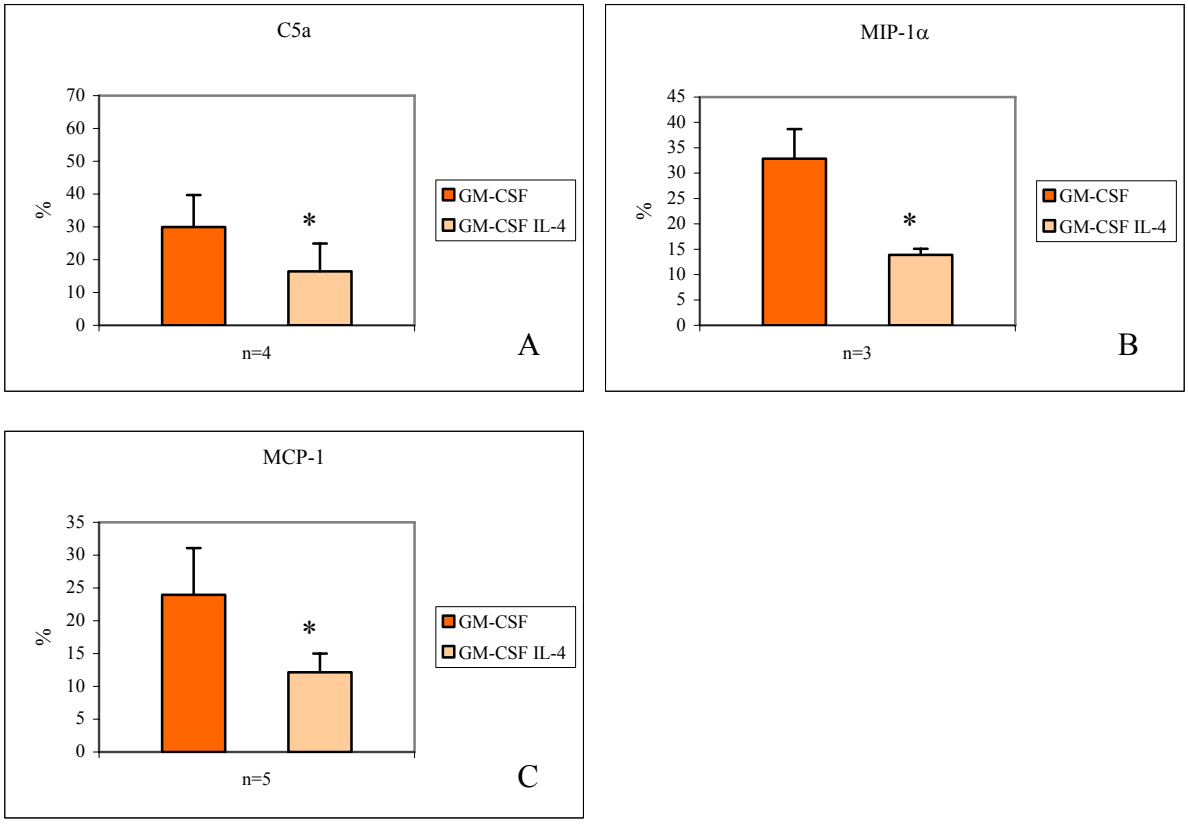


Abb. 21: IL-4 beeinträchtigt die Ca^{2+}-Freisetzung unter dem Einfluss verschiedener Chemotaxine. (A) C5a 100 ng/ml (n=4), (B) MIP-1α 100 ng/ml (n=3), (C) MCP-1 1000 g/ml (n=5). Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

3.2. Rezeptorexpression und Chemotaxis im humanen System

3.2.1. Generierung von DC aus $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen

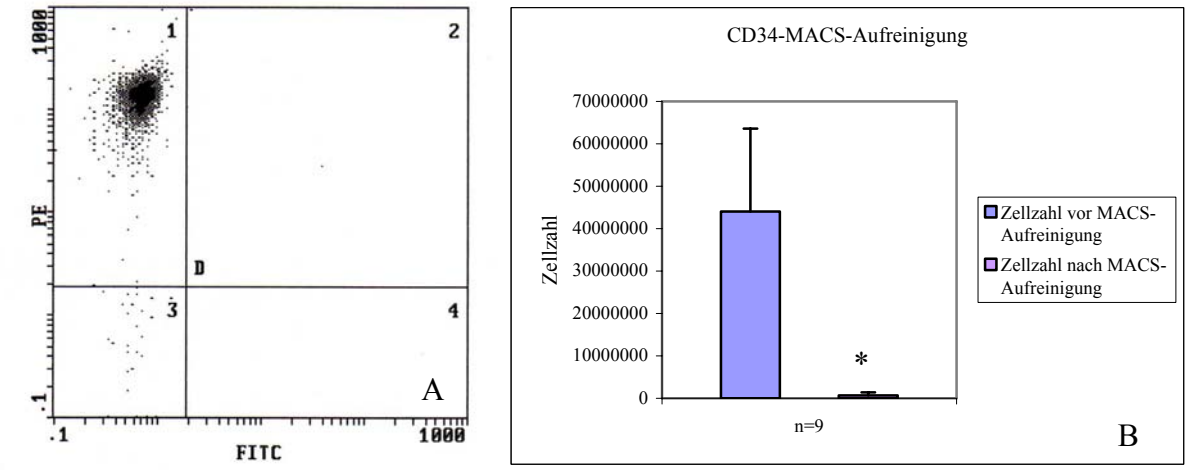


Abb. 22: $CD34^+$ hämatopoetische Zellen wurden durch MACS-Aufreinigung aus Nabelschnurblut gewonnen. (A) Einige Proben wurden auf die Effizienz der Aufreinigung hin überprüft. Dies geschah mittels PE-markiertem antihumanen CD34-Antikörpern. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 9. (B) Die Zellzahlen vor und nach der MACS-Aufreinigung unterschieden sich um das Hundertfache. ∗p<0,05

Um die Genauigkeit der CD34-MACS-Aufreinigung zu überprüfen, wurden stichprobenartig Kontrollfärbungen mit einem Antikörper durchgeführt, der ebenfalls gegen humanes CD34 gerichtet war, aber ein anderes Epitop erkannte, so dass eine sterische Behinderung zwischen den Antikörpern ausgeschlossen wurde (Abb. 22A). Die durchschnittliche Reinheit der hämatopoetischen Vorläuferzellen betrug 94,7 % und lag damit genau in dem vom Hersteller angegebenen Bereich von 85 - 98 % (Miltenyi Biotec Produktinformation).

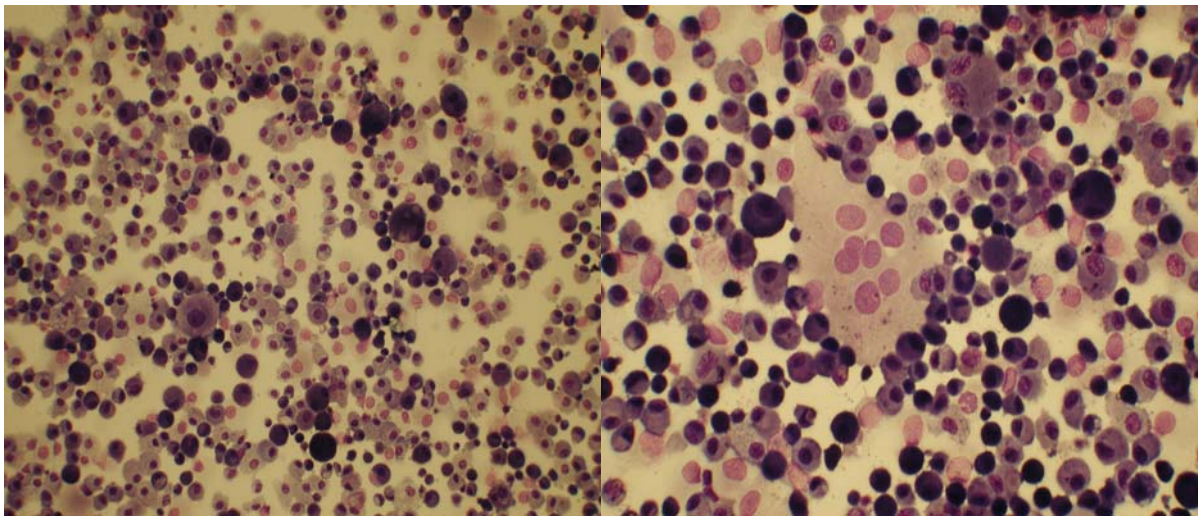


Abb. 23: Übersichtsaufnahmen Cytospin Nabelschnurblut 3 Wochen Kultivierung mit TPO, SCF, Flt3-L. Cytospins wurden gefärbt mit Eosin und Methylenblau. Die ausgeprägte Heterogenität der Kultur ist durch das Auftreten verschiedenster Zellpopulationen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gekennzeichnet.

Die Generierung von DC aus hämatopoetischen $CD34^+$ Vorläufern erwies sich als sehr zeitaufwendig, da die Zellausbeute nach der MACS-Aufreinigung nur zwischen 10^4 und 10^5 lag (Abb. 22B). Ursache hierfür war die geringe Ausgangsmenge an Nabelschnurblut mit durchschnittlich 20 ml. Da $CD34^+$ hämatopoetische Stammzellen verschiedenen Entwicklungslinien angehören und auch in ihrer Reihenzugehörigkeit noch nicht festgelegt sein müssen, wurde nach der MACS-Aufreinigung mit anti-CD34-Antikörpern eine stark heterogene Zellpopulation kultiviert. Um eine genügend große Zellzahl für die geplanten Versuche zu erhalten, mussten die hämatopoetischen Vorläufer für vier bis sechs Wochen kultiviert werden. Dabei entwickelten sie sich in die Richtung myeloider Vorstufen. Kulturen, die nicht umgehend gebraucht wurden, wurden nach der Proliferation eingefroren. Die Beurteilung der kultivierten Zellen erfolgte regelmäßig unter dem Mikroskop bei 400 facher Vergrößerung. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass nach 3 Wochen Kultivierung die Heterogenität der Kultur weiterhin vorhanden war. Unter dem Einfluss des Proliferationscocktails (TPO, SCF, Flt3-L) vermehrten sich die Zellen sehr rasch um das Einhundertfache. Durch eine Kontrollfärbung mit Antikörpern gegen CD3 (T-Zellmarker)

und CD19 (B-Zellmarker) konnte das Vorhandensein von Lymphozyten ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren waren keine erythrozytären Vorstufen in den Cytospins vorhanden. So konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den kultivierten Zellen hauptsächlich um Vertreter der myeloiden Entwicklungsreihen handeln musste. Dies wurde durch die Anfärbung von Oberflächenmarkern, die auf myeloiden Zellen vorkommen, bestätigt (Abb. 24). Die Zellen exprimierten zu einem großen Teil CD14 und zeigten auch, in unterschiedlichem Maße, das MHC Klasse II Protein HLA-DR (Abb. 24A). Die Anaphylatoxinrezeptoren für C5a und C3a konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 24B, 24C).

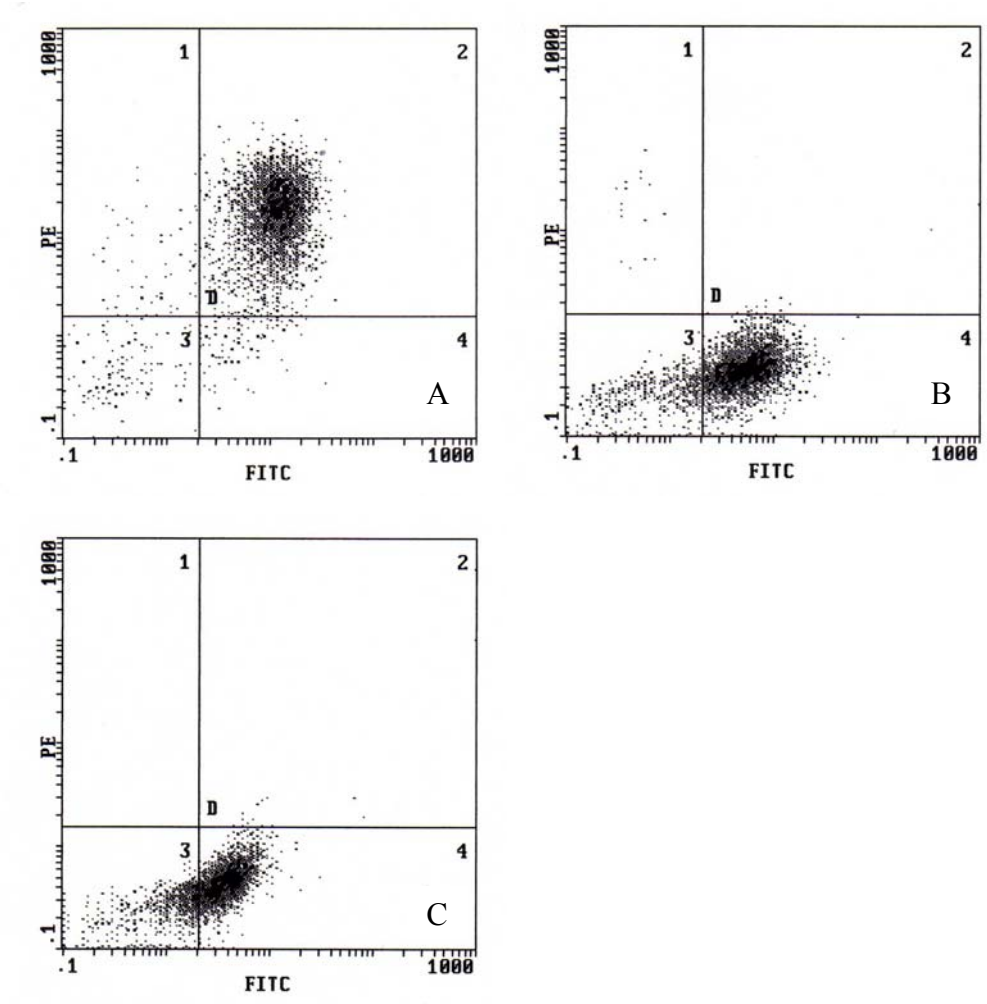


Abb. 24: $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut wurden 4 Wochen mit dem Proliferationscocktail (TPO, SCF, Flt3-L) kultiviert. Bevor der Cytokinwechsel zu GM-CSF mit und ohne IL-4 stattfand, wurde ein Teil der Zellen einer FACS-Färbung unterzogen. (A) Doppelfärbung HLA-DR PE und CD14 FITC. (B) C5aR-Expression. (C) C3aR-Expression. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 18.

Durch den Cytokinwechsel zu GM-CSF mit und ohne IL-4 wurden DC-Vorläuferzellen gezielt positiv selektiert. Dies garantierte die hohe Reinheit der Kultur.

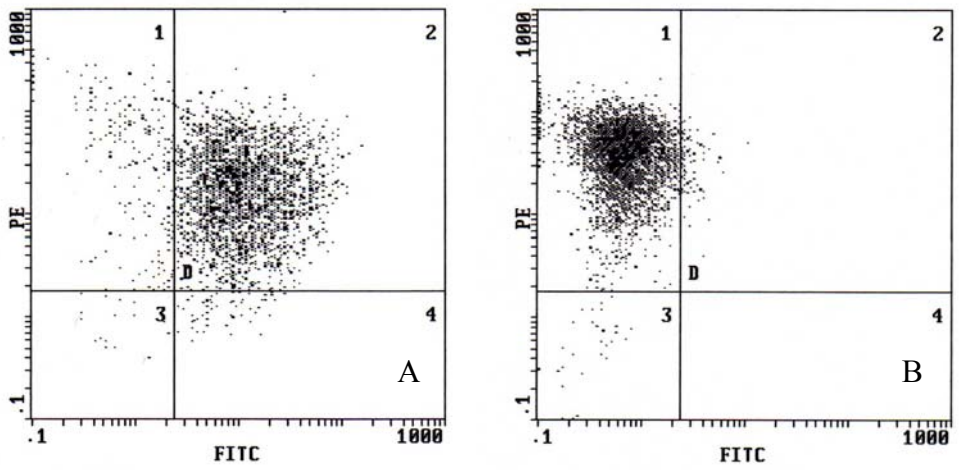


Abb. 25: IL-4 beeinträchtigt die Expression des myeloiden Markers CD14 (FITC) und erhöht die des MHC Klasse II Proteins HLA-DR (PE). (A) Expression von HLA-DR und CD14 nach vier Wochen Kultivierung mit TPO, SCF und Flt3-L und zwei Wochen GM-CSF. (B) Expression von HLA-DR und CD14 nach vier Wochen mit TPO, SCF und Flt3-L und zwei Wochen GM-CSF und IL-4. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 18.

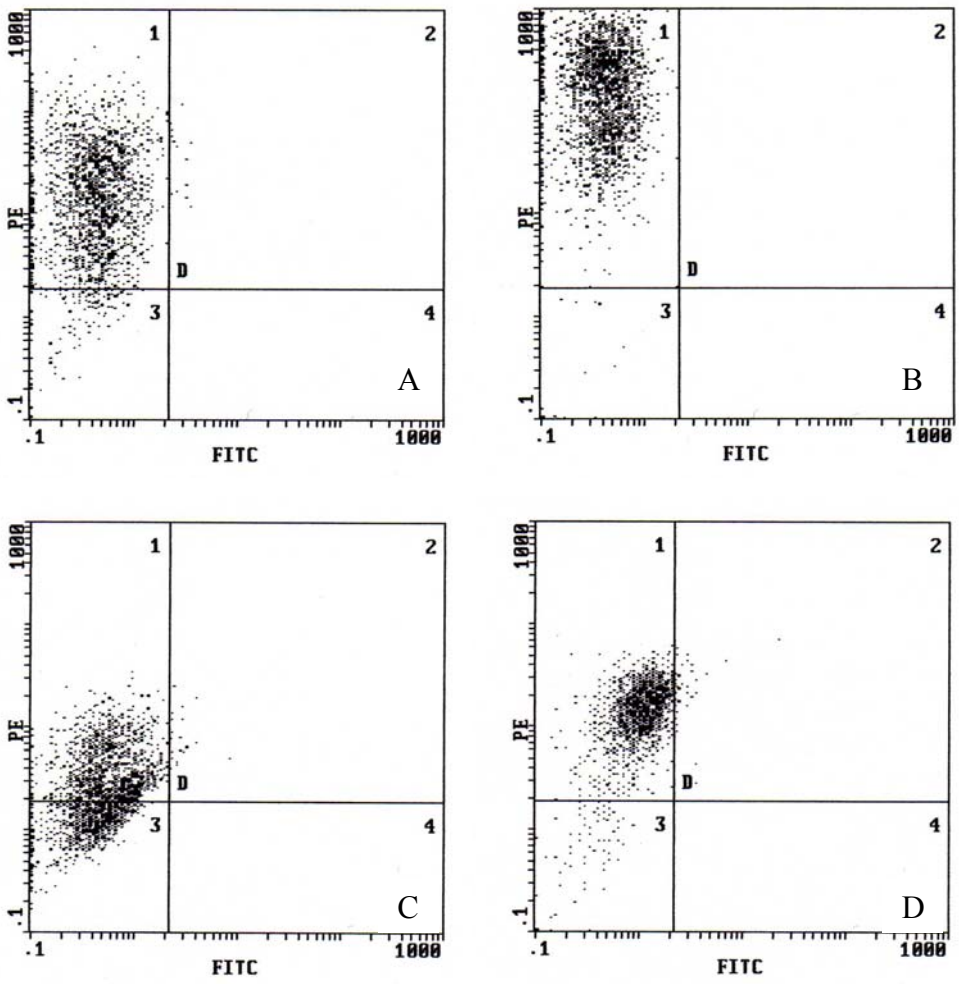


Abb. 26: LPS erhöht die Expression von HLA-DR (PE) und den kostimulatorischen Molekülen CD83 (FITC) und CD86 (PE). (A) GM-CSF/IL-4-Zellen. Expression von HLA-DR. (B) GM-CSF/IL-4 Zellen wurden 48 h mit LPS stimuliert. Expression von HLA-DR. (C) GM-CSF/IL-4-Zellen. Expression von CD83 und CD86. (D) GM-CSF/IL-4 Zellen wurden 48 h mit LPS stimuliert. Expression von CD83 und CD86. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 18.

Am Tag der Ernte wurden die Zellen einer FACS-Färbung der Oberflächenmoleküle HLA-DR und CD14 (Abb. 25A, 25B), C5aR und C3aR (Abb. 28A, 28C) unterzogen. Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um DC handelte, reiften einige ausgewählte GM-CSF/IL-4-Kulturen für 48 h unter dem Einfluss von LPS (250 ng/ml). Dies bewirkte eine gesteigerte Expression von HLA-DR und das Auftreten von CD83 und CD86 auf der Zelloberfläche (Abb. 26). Eine große Menge an MHC Klasse II und die Expression von kostimulatorischen Molekülen sind typische Merkmale reifer Dendritischer Zellen.

3.2.2. Einfluss von IL-4 und IL-13 auf Anaphylatoxinrezeptoren auf humanen MoDC

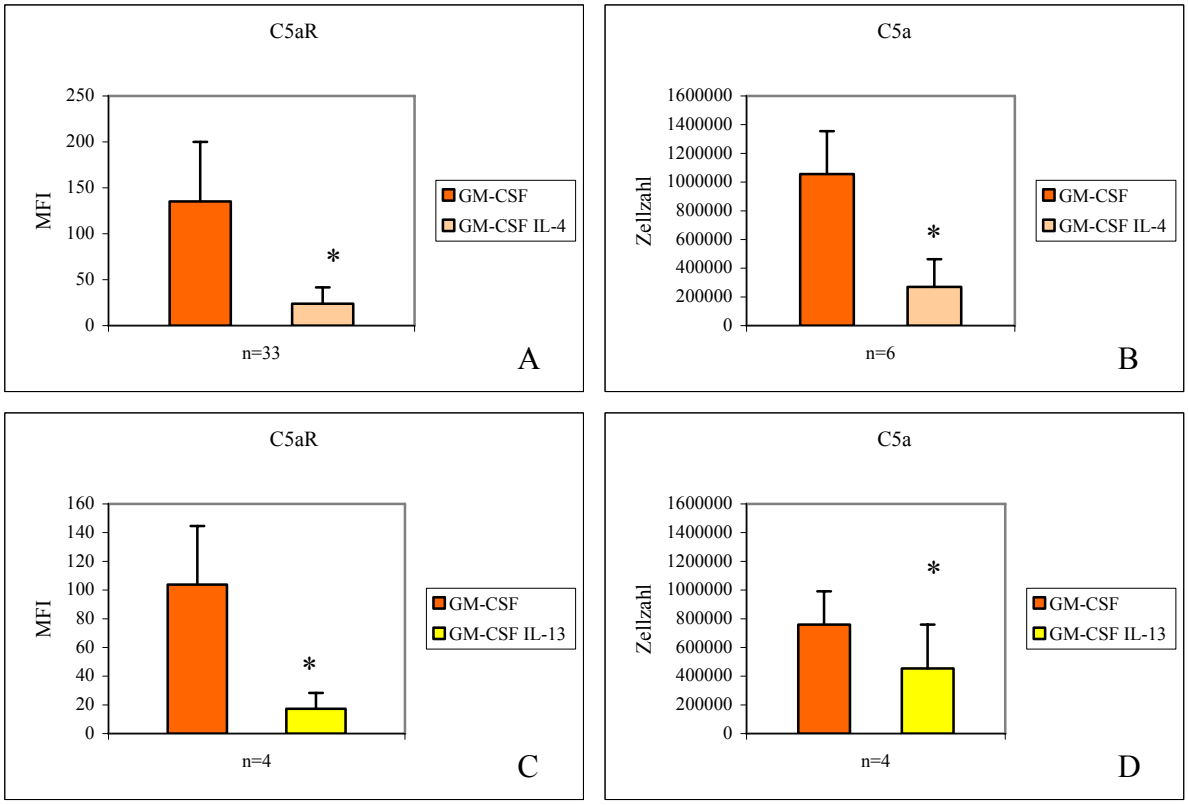


Abb. 27: IL-4 und IL-13 beeinträchtigen Expression und Funktion von C5aR auf humanen aus Monozyten generierten DC. (A) C5aR-Expression auf DC, die mit IL-4 kultiviert wurden (n=33). (B) *In vivo* Migration dieser Zellen gegen C5a (n=6). (C) C5aR-Expression auf DC, die mit IL-13 kultiviert wurden (n=4). (D) *In vivo* Migration dieser Zellen gegen C5a (n=4). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. $*p<0,05$

Humane Monozyten wurden für zwei Tage mit und ohne IL-4 oder für sieben Tage unter Zugabe von GM-CSF mit und ohne IL-4 bzw. IL-13 kultiviert. Die Anaphylatoxinrezeptorexpression wurde mittels indirekter FACS-Färbung und anschließender FACS-Analyse ermittelt. Für die *in vivo* Migrationsstudien wurden die humanen Zellen in SCID-Mäuse in eine der Schwanzvenen i.v. appliziert und die Anaphylatoxine i.p. injiziert.

Nach 15-18 h wurden die Peritonealzellen mittels Lavage geerntet und durch die Verwendung von anti-HLA-DR-PE in Kombination mit anti-CD14-FITC bzw. anti-CD86-FITC gefärbt, um die gewanderten humanen Zellen per FACS-Analyse identifizieren zu können.
SORURI *et al*. (2003A) haben bereits gezeigt, dass IL-4 den humanen C5aR auf Monozyten und auf DC, die aus Monozyten generiert wurden, herunterreguliert und ebenfalls die C5a-induzierte Migration dieser Zellen hemmt.

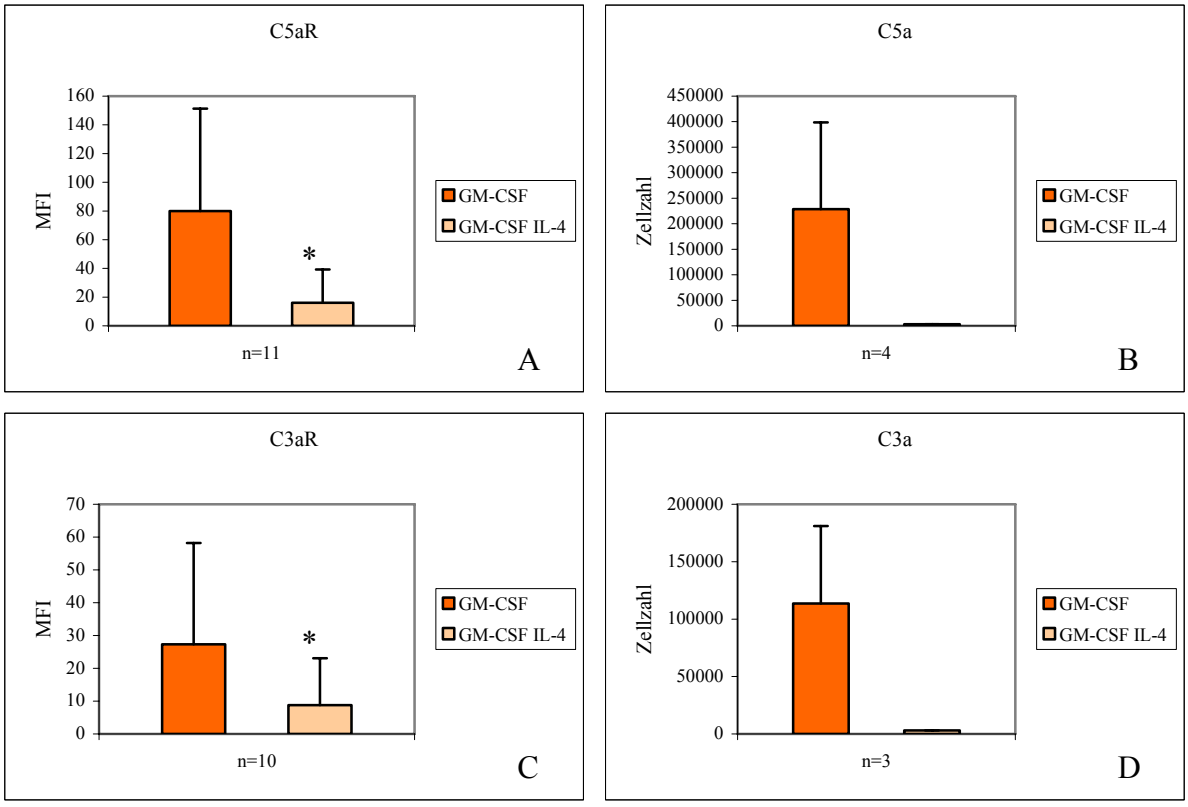


Abb. 28: IL-4 beeinträchtigt die Expression von Anaphylatoxinrezeptoren auf DC, die von $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut abstammen. (A) C5aR-Expression mit und ohne IL-4. (B) *In vivo* Migration gegen C5a. (C) C3aR-Expression mit und ohne IL-4. (D) *In vivo* Migration gegen C3a (40 µg). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. $*p<0,05$

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Verringerung der Menge des C5aR und die Hemmung seiner Funktion sowohl auf MoDC als auch auf DC, die aus $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut generiert wurden, ein Resultat des Effektes von IL-4 (Abb. 27A, 27B, 28A) und bei MoDC auch von IL-13 war (Abb. 27C, 27D). Ähnliches konnte für den C3aR auf nabelschnurblutgenerierten DC gezeigt werden (Abb. 28C, 28D).

3.2.3. Einfluss von IL-4 auf Chemokinrezeptoren von humanen Monozyten und MoDC

Auch für die Untersuchung der Chemokinrezeptoren wurden humane Monozyten für zwei Tage mit und ohne IL-4 oder für sieben Tage unter Zugabe von GM-CSF mit und ohne IL-4 kultiviert. Die Rezeptorexpression wurde mittels indirekter FACS-Färbung und nachfolgend durch FACS-Analyse untersucht. Für die *in vivo* Wanderungsversuche wurden die humanen Zellen in SCID-Mäuse i.v. in eine Schwanzvene appliziert und die Chemokine (jeweils 10 µg) i.p. injiziert. Nach 4 h bzw. 15-18 h wurden die Peritonealzellen mittels Lavage geerntet und durch die Verwendung von anti-HLA-DR-PE in Kombination mit anti-CD14-FITC bzw. anti-CD86-FITC gefärbt, um die gewanderten humanen Zellen per FACS-Analyse identifizieren zu können.

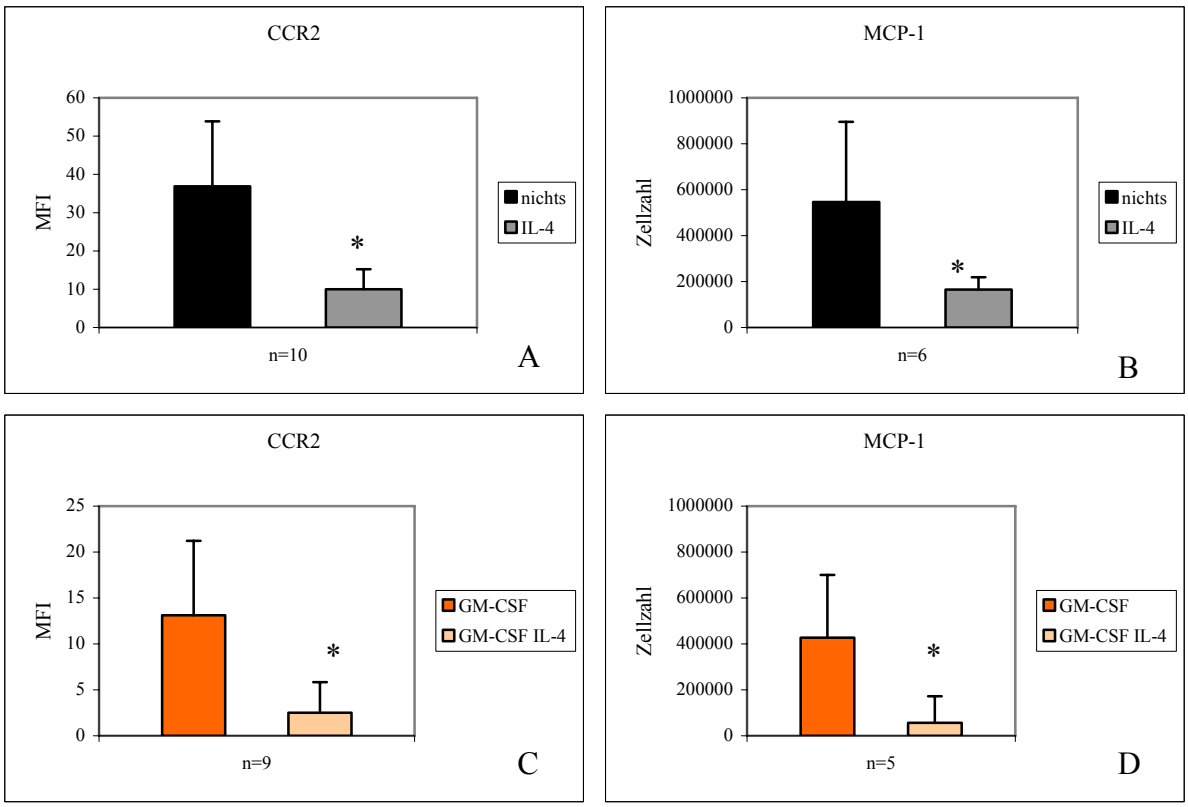


Abb. 29: IL-4 beeinträchtigt die Expression von Chemokinrezeptoren auf Monozyten und DC. (A) CCR2-Expression auf Monozyten, die für zwei Tage kultiviert wurden (n=10). (B) *In vivo* Migration dieser Zellen gegen humanes MCP-1 (n=6). (C) CCR2-Expression auf DC (n=9). (D) *In vivo* Migration dieser Zellen gegen humanes MCP-1 (n=5). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. $*p<0,05$

Ähnlich wie im Mausversuch war der IL-4-Effekt auf die humanen Zellen nicht auf die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C3aR beschränkt. IL-4 verminderte ebenso die Expression von CCR2 auf humanen Monozyten (Abb. 29A, 29B) und monozytengenerierten DC (Abb. 29C, 29D). Es inhibierte auch die MCP-1-induzierte Migration dieser Zellen *in*

vivo. Die Migration von monozytengenerierten DC in Richtung des CCR4-Liganden MDC war ebenfalls durch die Kultivierung der Zellen mit IL-4 vermindert (Daten nicht gezeigt).
Die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 auf Monozyten wurde unter dem Einfluss von IL-4 verringert (Abb. 30A, 30B). Dazu passend konnte eine signifikant reduzierte Zellrekrutierung durch den Liganden MIP-1α beobachtet werden (Abb. 30C). Ebenso zeigten die monozytengenerierten DC eine weniger effiziente MIP-1α-induzierte Mobilisierung im Vergleich zu den Zellen, die nur mit GM-CSF kultiviert wurden. Allerdings war keine ausgeprägte Abnahme von CCR1 und CCR5 auf den DC durch die Zugabe von IL-4 zu verzeichnen (Abb. 31A, 31B). Die eingeschränkte *in vivo* Migration (Abb. 31C) trotz relativ gleich bleibender Rezeptorexpression ließe sich durch eine Rezeptorentkopplung von den zugehörigen Signaltransduktionswegen oder aber durch eine Blockade oder einen Mangel involvierter Signalmoleküle erklären.

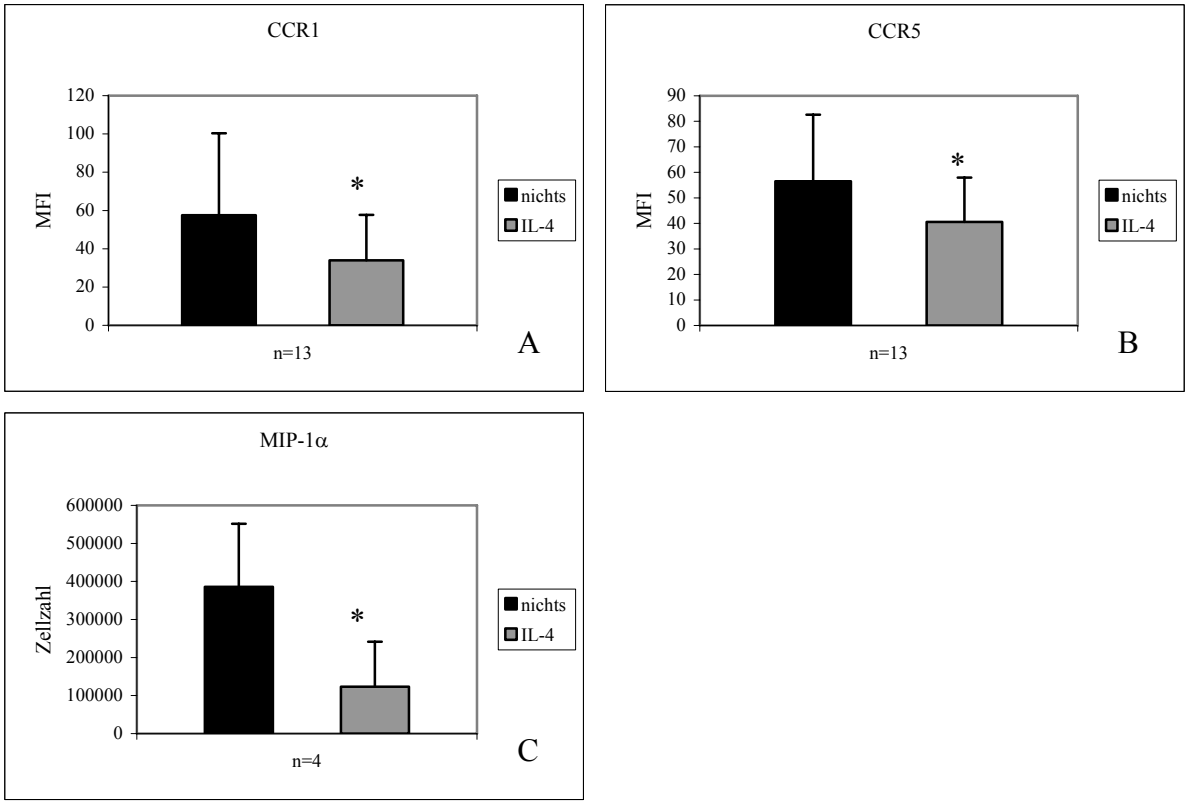


Abb. 30: IL-4 beeinträchtigt die Expression von Chemokinrezeptoren auf Monozyten, die für zwei Tage kultiviert wurden. (A) Expression von CCR1 (n=13) und (B) von CCR5 (n=13). (C) *In vivo* Migration dieser Zellen gegen humanes MIP-1α (n=4). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

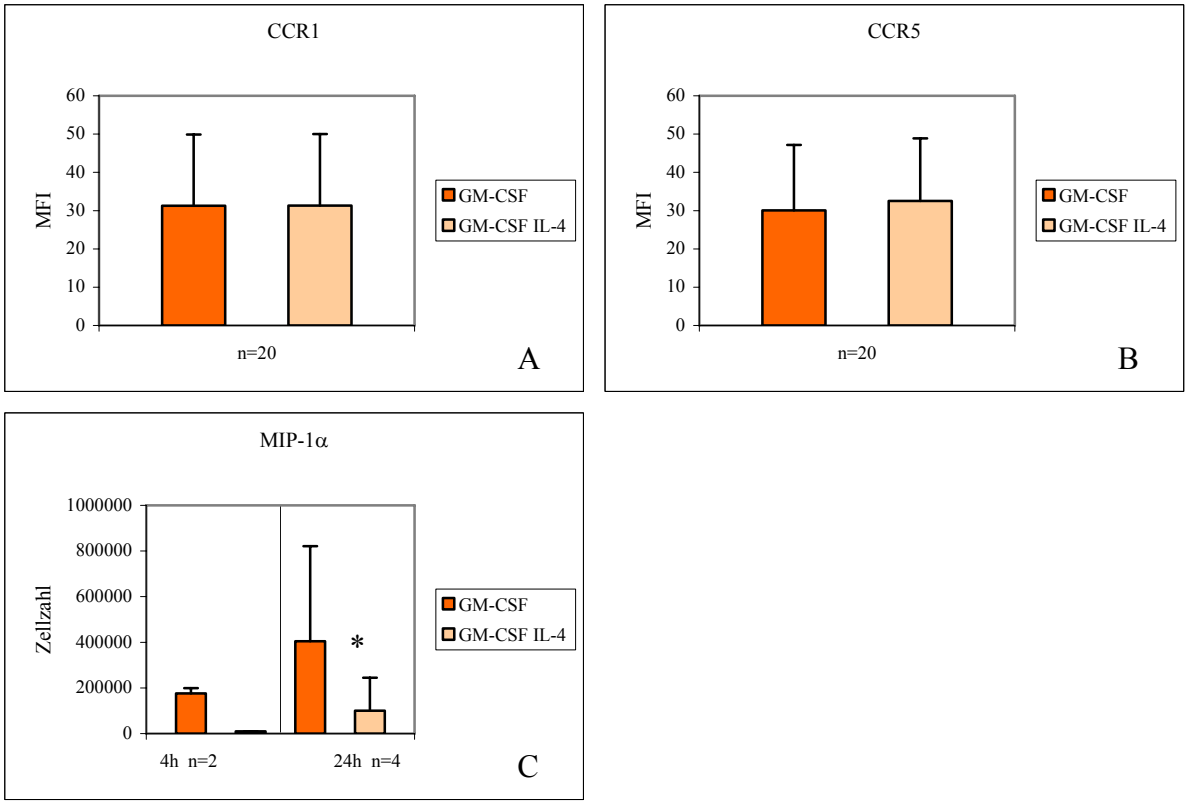


Abb. 31: IL-4 beeinträchtigt die Expression von Chemokinrezeptoren auf DC. (A) Expression von CCR1 (n=20) und (B) von CCR5 (n=20). (C) *In vivo* Migration dieser Zellen gegen humanes MIP-1α (4 h n=2 und 15-18 h n=4, für n=6 gilt $*p< 0,05$). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben.

3.2.4. Einfluss von PGE_2 auf chemotaktische Rezeptoren auf humanen monozytengenerierten Dendritischen Zellen

Um den Einfluss von PGE_2 auf die Expression von Chemotaxinrezeptoren untersuchen zu können, wurden humane Monozyten für zwei Tage mit und ohne IL-4 bzw. PGE_2 und für sieben Tage mit GM-CSF plus IL-4 mit und ohne PGE_2 kultiviert. Die Analyse der Rezeptorexpression und die *in vivo* Migrationsstudien wurde wie oben angegeben durchgeführt.

LEGLER *et al*. (2006) zeigten, dass PGE_2 *in vitro* in seiner Funktion als inflammatorischer Mediator MoDC in Richtung des Anaphylatoxins C5a mobilisieren kann ohne die C5aR Expression signifikant zu beeinträchtigen. In Ergänzung dazu demonstriert die vorliegende Studie PGE_2 als potenten Modulator für die C5aR-Menge auf der Zelloberfläche von Monozyten (Abb. 32C), MoDC (Abb. 33A) und DC aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Abb. 34), wenn diese mit IL-4 kultiviert wurden. Parallel zur Erhöhung der C5aR-Menge war die *in vivo* Chemotaxis gegen C5a in mit IL-4 und PGE_2 kultivierten Monozyten (Abb. 32D) und MoDC (Abb. 33B) ebenfalls stark erhöht. In Abwesenheit von IL-4 blieb PGE_2

ohne Einfluss auf die C5aR-Expression auf Monozyten *in vitro* und auf die C5a-induzierte Wanderung *in vivo* (Abb. 32A, 32B).

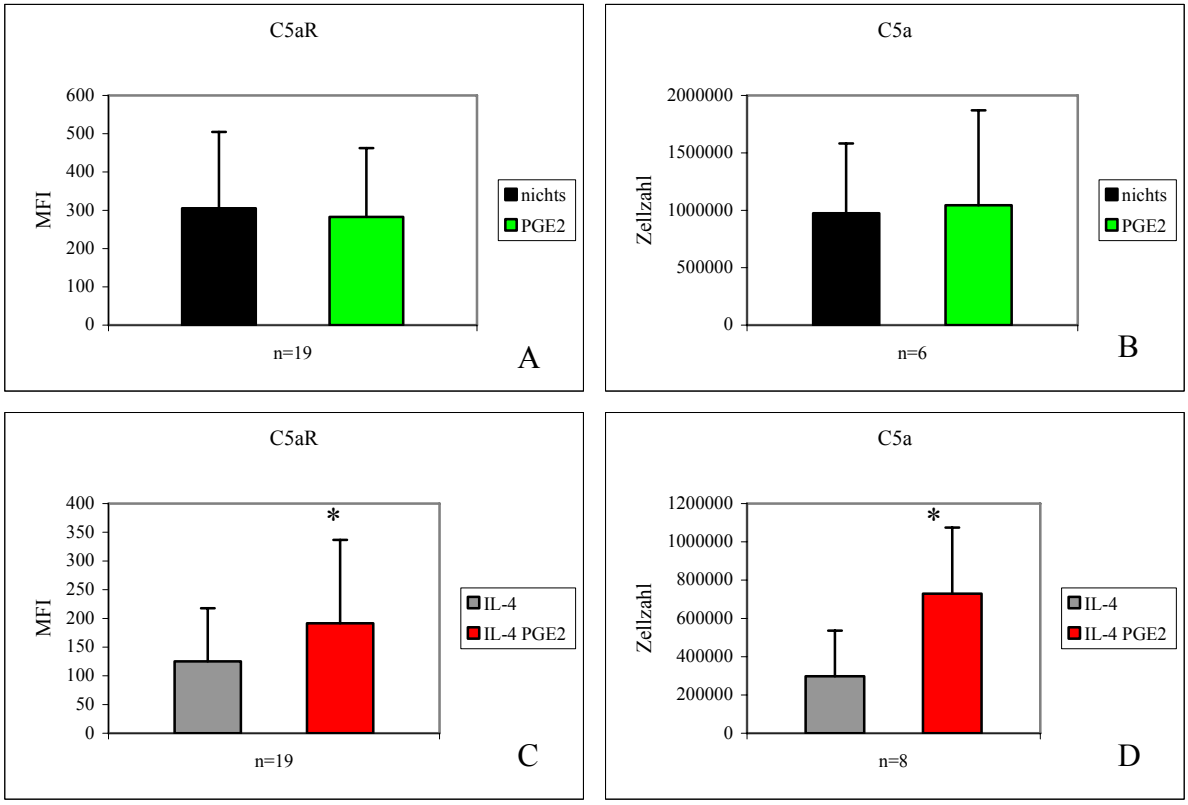


Abb. 32: PGE_2 moduliert die Expression und Funktion vom C5aR auf humanen Monozyten, die für zwei Tage kultiviert wurden. (A) C5aR-Expression auf Monozyten (n=19). (B) *In vivo* Migration gegen C5a (n=6). (C) C5aR-Expression auf Monozyten (n=19). (D) *In vivo* Migration gegen C5a (n=8). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

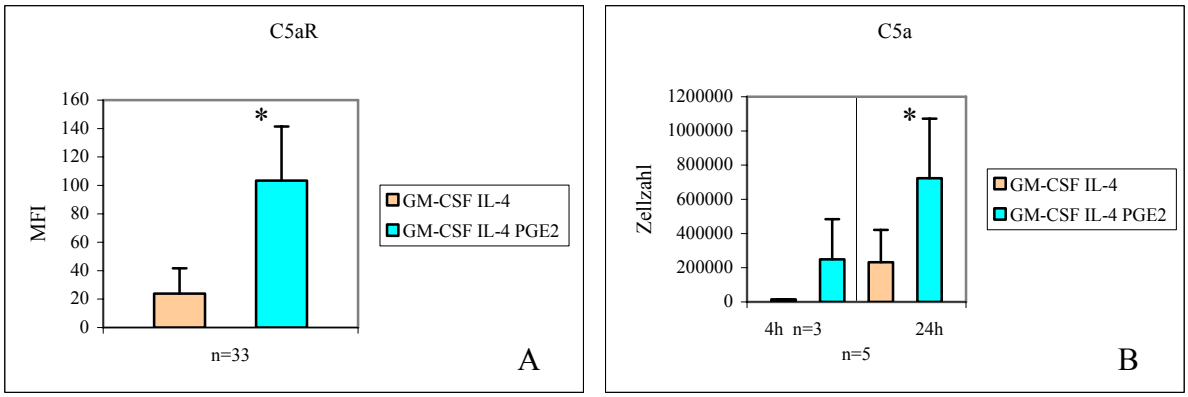
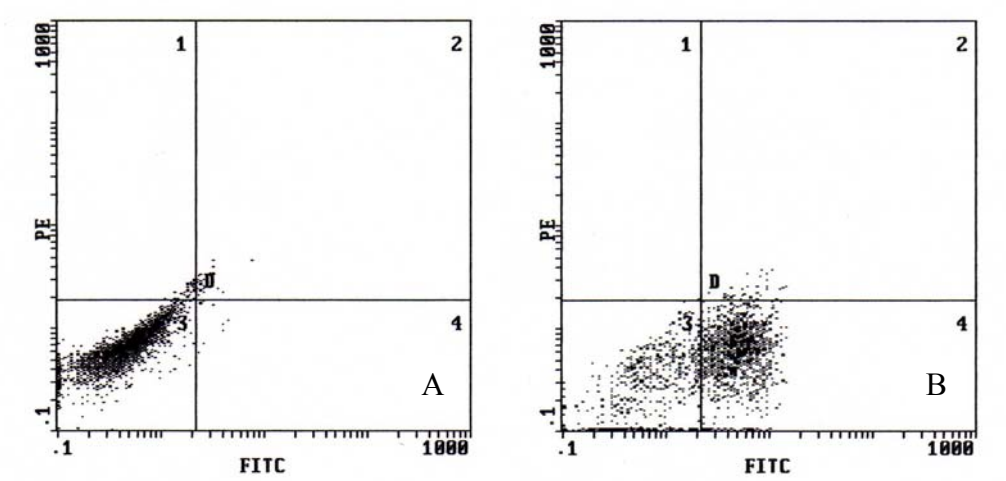


Abb. 33: PGE_2 moduliert die Expression und Funktion vom C5aR auf humanen DC. (A) C5aR-Expression auf DC (n=33). (B) *In vivo* Migration gegen C5a (4 h n=3 und 15-18 h n=5, für n=8 gilt ∗p<0,05). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben.



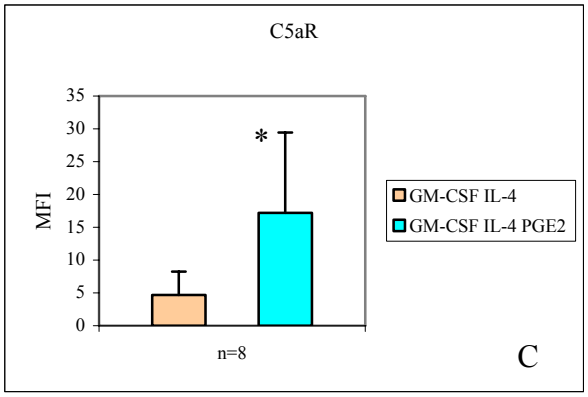


Abb. 34: PGE_2 moduliert die Expression und Funktion vom C5aR auf humanen DC, die aus $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut generiert wurden. (A) C5aR-Expression auf mit GM-CSF und IL-4 kultivierten Zellen. (B) C5aR-Expression auf mit GM-CSF, IL-4 und PGE_2 kultivierten Zellen. (C) C5aR-Expression auf DC. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. $*p<0,05$

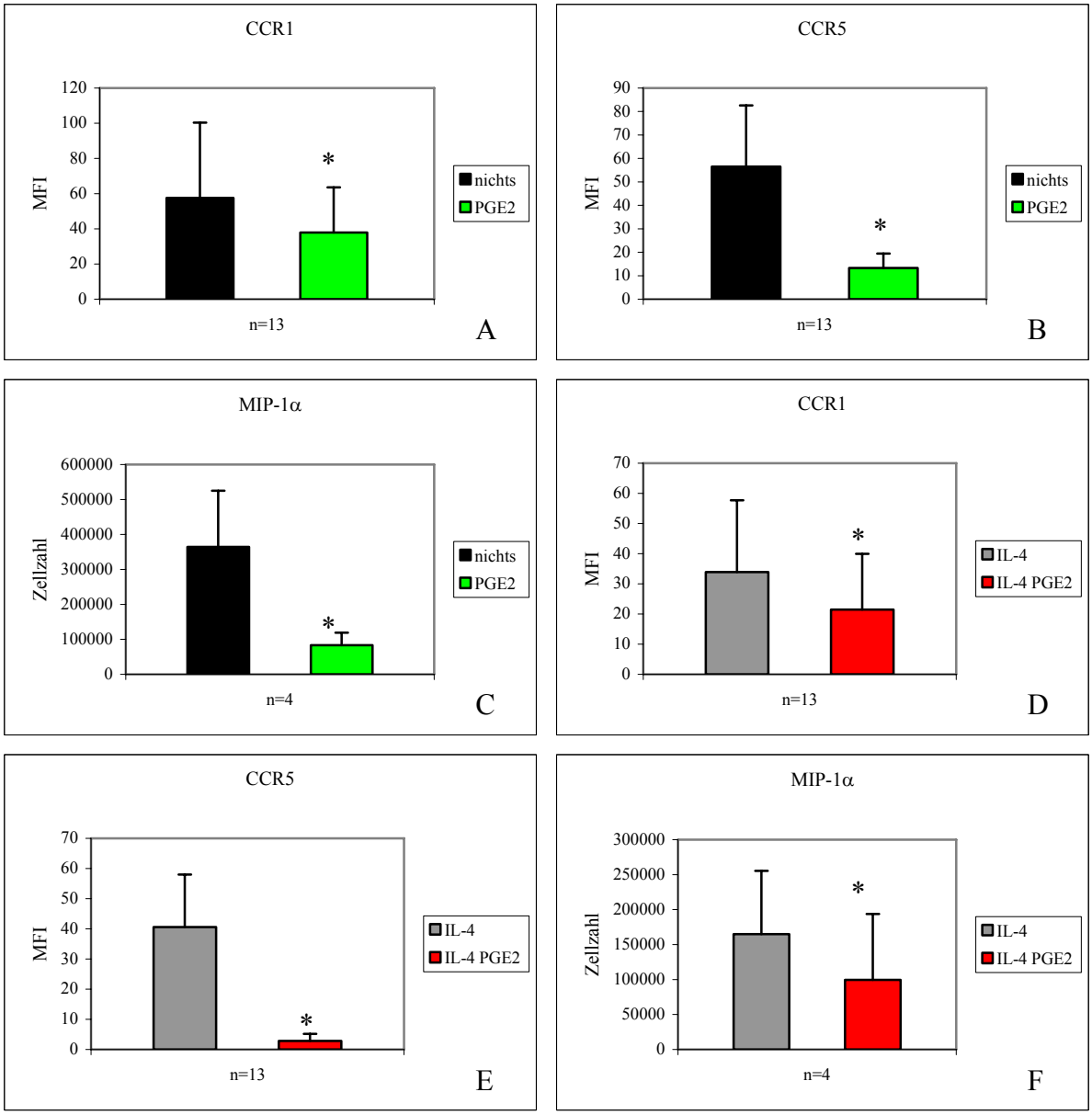


Abb. 35: PGE_2 moduliert die Expression und Funktion von Chemokinrezeptoren auf humanen Monozyten, die für zwei Tage kultiviert wurden. (A) CCR1- (n=13) und (B) CCR5-Expression (n=13). (C) *In vivo* Migration gegen MIP-1α (n=4). (D) CCR1- (n=13) und (E) CCR5-Expression (n=13). (F) *In vivo* Migration gegen MIP-1α (n=4). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

Da vermutet wird, dass PGE_2 grundsätzlich für die DC-Migration von Bedeutung ist, wurde zusätzlich der Einfluss von PGE_2 auf die MIP-1α-induzierte Chemotaxis *in vivo* sowie auf die Expression der MIP-1α Rezeptoren CCR1 und CCR5 *in vitro* untersucht. Werden Monozyten und aus Monozyten generierte DC mit IL-4 kultiviert, reagieren beide Zelltypen auf externes PGE_2 mit einer moderaten Erniedrigung der CCR1-Menge (Abb. 35D, 36A), aber mit einem starken Abfall von CCR5 auf der Zelloberfläche (Abb. 35E, 36B). Parallel zur Abnahme von CCR5 wurde die *in vivo* Chemotaxis gegen MIP-1α signifikant gehemmt (Abb. 35F, 36C). Der inhibierende Effekt von PGE_2 auf die Expression und die Funktion von CCR1 und CCR5

wurde auch in Abwesenheit von IL-4 beobachtet (Abb. 35A, 35B, 35C). Demnach moduliert PGE_2 die Expression und Funktion vom C5aR und von Chemokinrezeptoren auf humanen DC und Monozyten in unterschiedlicher Weise.

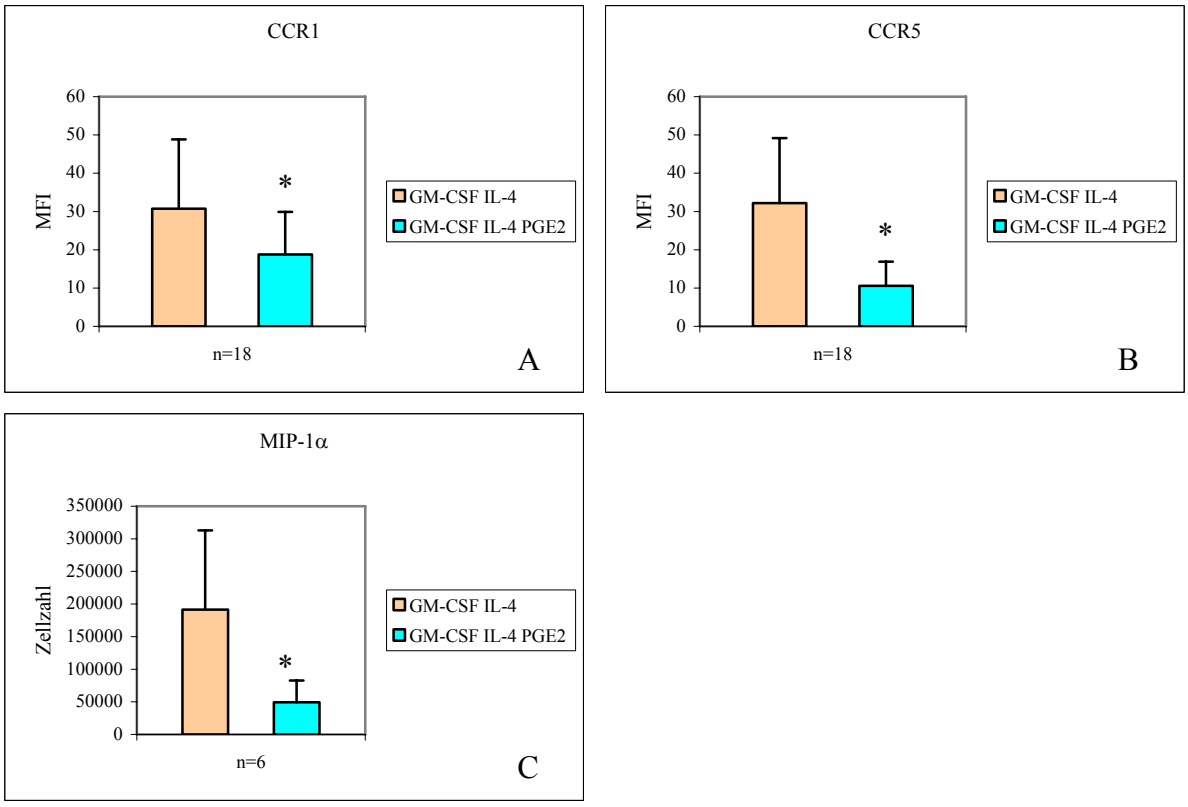


Abb. 36: PGE_2 moduliert die Expression und Funktion von Chemokinrezeptoren auf humanen DC. (A) CCR1- (n=18) und (B) CCR5-Expression (n=18). (C) *In vivo* Migration gegen MIP-1α (n=6). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt. Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

3.2.5. Einfluss von PGE_2 auf C5aR und CCR7 im SCID-Mausmodell

Es ist bekannt, dass PGE_2 zusammen mit TNF-α eine schnelle Differenzierung von humanen Monozyten in reife DC im SCID-Mausmodell bewirkt (SORURI *et al.*, 2003B). Diese Erkenntnis war die Grundlage für die Untersuchung des Einflusses von PGE_2 auf C5aR im Vergleich zur CCR7-Expression auf humanen Monozyten *in vivo*. In Abbildung 36 werden FACS-Daten präsentiert, welche die Umwandlung von wandernden Monozyten in reife CCR7-exprimierende Dendritische Zellen unter dem Einfluss von PGE_2 und TNF-α *in vivo* dokumentieren. Dieser Reifungsprozess ist charakterisiert durch die signifikante Reduktion des C5aR (Abb. 37E) und des Monozyten-/Makrophagenmarkers CD14 (Abb. 37A), durch die Erhöhung der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 (Abb. 37B) und CD83 (Abb. 37C) und durch die Ausbildung des Chemokinrezeptors CCR7 (Abb. 37D) auf der Zelloberfläche. Die Änderung der Ausprägung dieser Oberflächenproteine ist Ausdruck der

Entwicklung der unreifen DC zu reifen antigenpräsentierenden Zelle. Der Einsatz von PGE_2 allein hat keinen Effekt auf die Expression der Rezeptoren C5aR und CCR7 (Daten nicht gezeigt).

Für diese Versuchsreihe wurden Monozyten ($1x10^7$) in SCID-Mäuse in eine der Schwanzvenen injiziert und humanes MIP-1α (10 µg) i.p. appliziert. Nach 24 h erfolgte eine Wiederholung der Injektion mit MIP-1α (10 µg). Zusammen mit der MIP-1α-Injektion wurden die Mäuse zusätzlich mit TNF-α (2 x 500 ng) plus PGE_2 (2 x 500 ng) behandelt. Die Kontrolltiere erhielten MIP-1α i.p. und PBS i.v. (Ø). Nach weiteren 24 h wurden die Peritonealzellen durch Lavage geerntet, gezählt, gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Gates wurden auf $HLA\text{-}DR^+$ humane Zellen gesetzt.

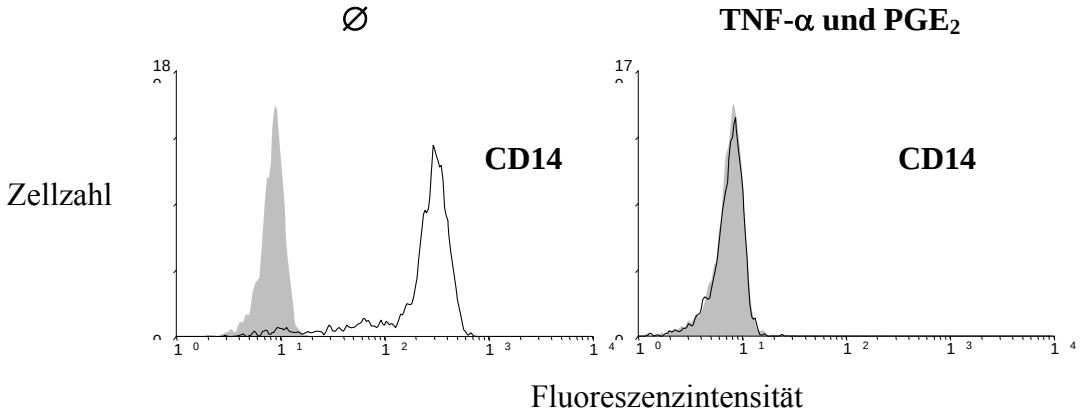


Abb. 37A: Monozytendifferenzierung durch TNF-α und PGE_2. TNF-α und PGE_2 induzieren *in vivo* die Differenzierung von humanen Monozyten in DC. Graue Histogramme stellen die Isotypkontrolle dar, offene Histogramme die Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=3.

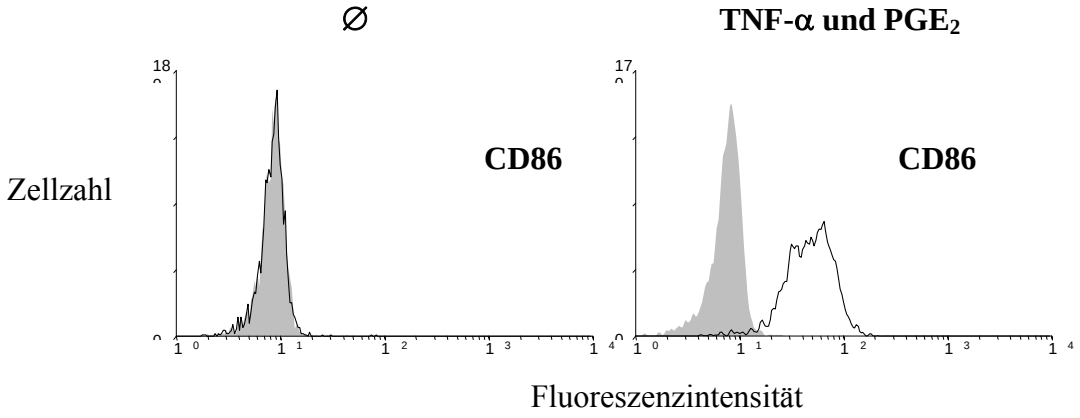


Abb. 37B: Monozytendifferenzierung durch TNF-α und PGE_2. TNF-α und PGE_2 induzieren *in vivo* die Differenzierung von humanen Monozyten in DC. Graue Histogramme stellen die Isotypkontrolle dar, offene Histogramme die Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD86. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=3.

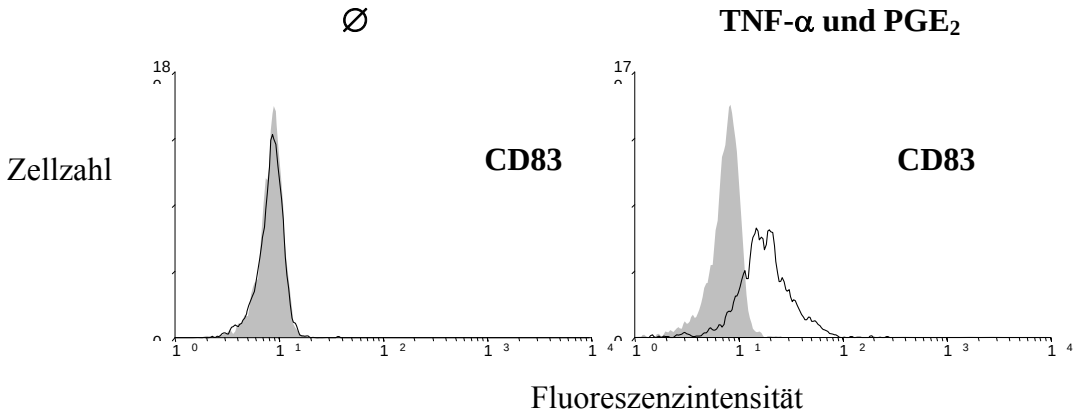


Abb. 37C: Monozytendifferenzierung durch TNF-α und PGE_2. TNF-α und PGE_2 induzieren *in vivo* die Differenzierung von humanen Monozyten in DC. Graue Histogramme stellen die Isotypkontrolle dar, offene Histogramme die Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD83. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=3.

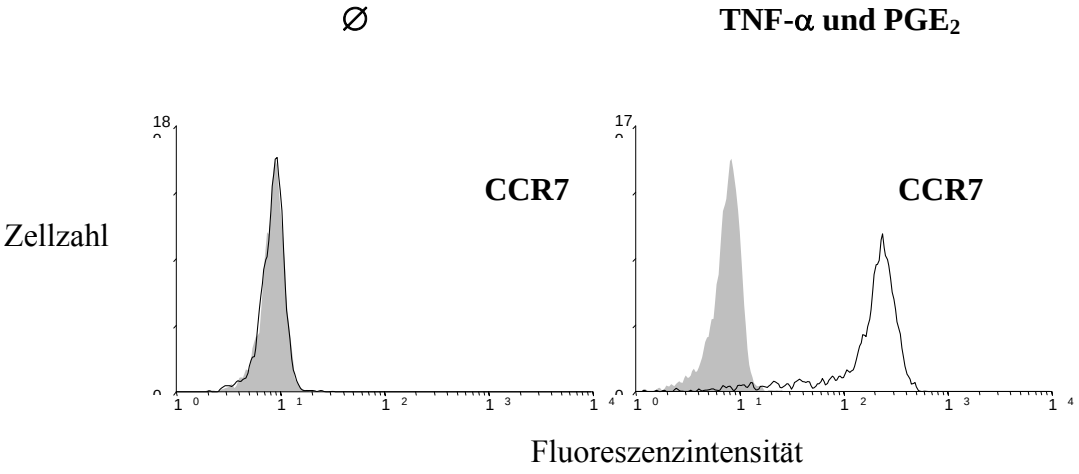


Abb. 37D: Monozytendifferenzierung durch TNF-α und PGE_2. TNF-α und PGE_2 induzieren *in vivo* die Differenzierung von humanen Monozyten in DC. Graue Histogramme stellen die Isotypkontrolle dar, offene Histogramme die Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CCR7. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=3.

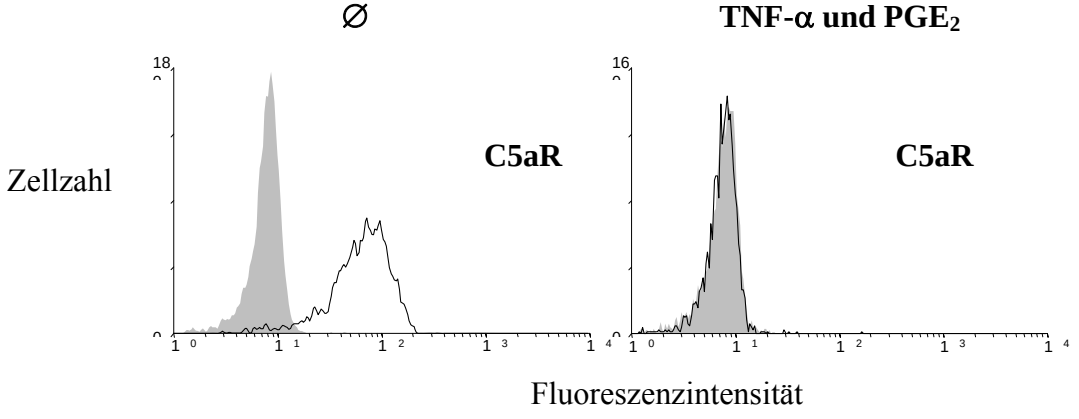


Abb. 37E: Monozytendifferenzierung durch TNF-α und PGE_2. TNF-α und PGE_2 induzieren *in vivo* die Differenzierung von humanen Monozyten in DC. Graue Histogramme stellen die Isotypkontrolle dar, offene Histogramme die Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen C5aR. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=3.

3.2.6. Einfluss von IL-4 und PGE_2 auf das Wanderungsverhalten von DC *in vitro*

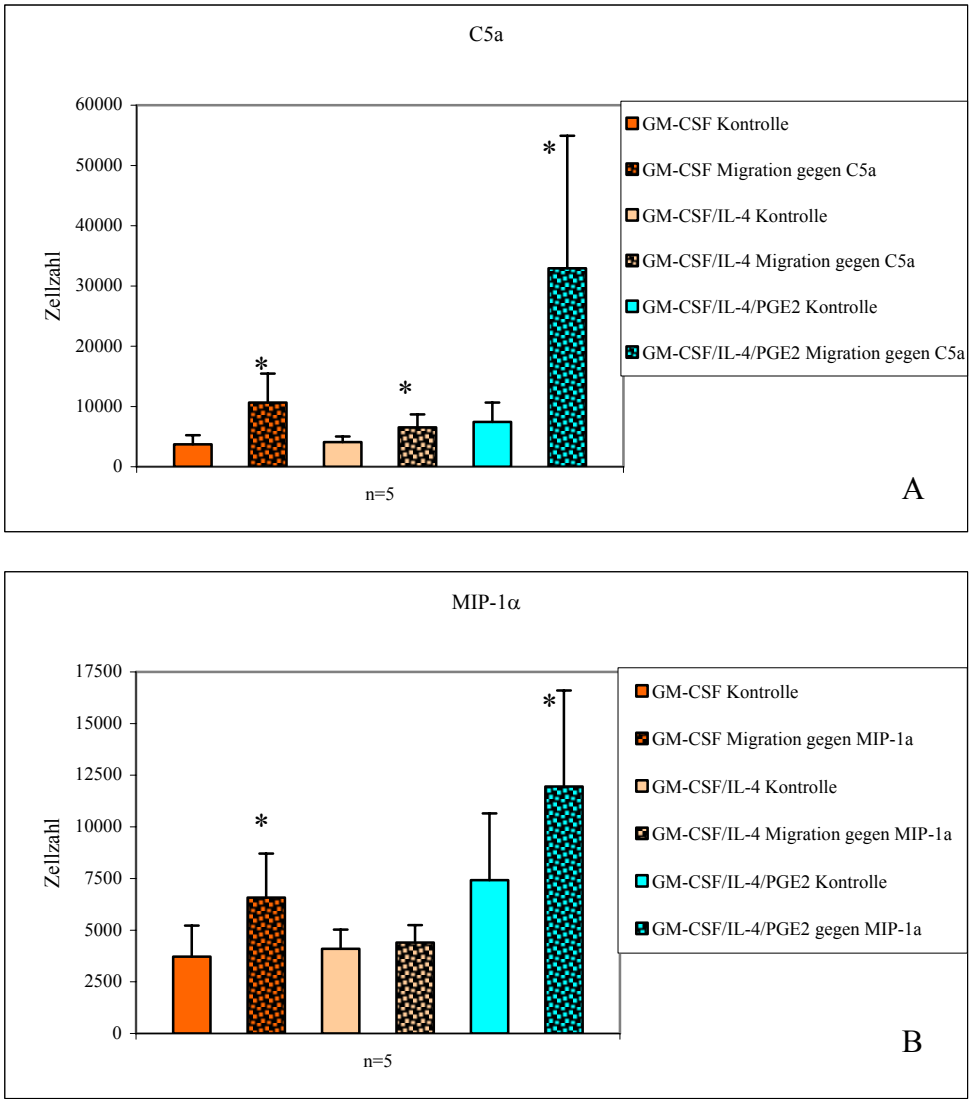


Abb. 38: Leukapheresezellen wurden für 48 h kultiviert. Die Zellen wanderten *in vitro* entweder ohne Zugabe eines Chemotaxins (Kontrolle) oder unter dem Einfluss von C5a bzw. MIP-1α. (A) *In vitro* Wanderung gegen C5a 100 ng/ml (n=5). (B) *In vitro* Wanderung gegen MIP-1α 100 ng/ml (n=5). Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. Vergleich Kontrolle mit Wanderung gegen Chemotaxin $*p<0,05$.

Die Migration der Zellen *in vitro* gegen C5a korrelierte annähernd mit der Expression des C5aR. Zellen, die mit PGE_2 kultiviert wurden, regulierten den C5aR herauf und zeigten in der Chemotaxis *in vitro* ein ungleich ausgeprägtes Vermögen in Richtung des C5a-Gradienten zu wandern (Abb. 38A). Da auch die Zellen in den Kontrollansätzen eine große Motilität aufwiesen, ist anzunehmen, das PGE_2 die Beweglichkeit von DC positiv beeinflussen kann. Dies könnte essentiell sein für das Migrationsverhalten der DC *in vivo*. Die Zellen, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden, waren hingegen nur sehr eingeschränkt in der Lage, auf

den Reiz durch C5a zu reagieren. Es bestand eine Korrelation zwischen der geringen Menge von C5aR auf der Zelloberfläche und der verminderten Wanderungsfähigkeit dieser Zellen.
Die Migration gegen MIP-1α ist insgesamt schwächer als die gegen C5a (Abb. 38B). Allerdings sind auch hier die mit PGE_2 kultivierten Zellen am besten in der Lage, auf den Liganden zu reagieren. Dies widerspricht den FACS-Ergebnissen, da PGE_2 CCR5 sehr deutlich herunterreguliert (Abb.36). Weiterhin könnte die oben erwähnte Möglichkeit der vermuteten PGE_2-induzierten unspezifischen Motilitätssteigerung bestehen.
Die Wanderung der mit PGE_2 kultivierten Zellen in den Kontrollen ist signifikant erhöht gegenüber den Zellen, die mit GM-CSF bzw. GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden ($p<0,05$). Da PGE_2 die Kontrollmigration der Zellen in etwa verdoppelt, wird dadurch das Ergebnis der *in vitro* Chemotaxis insgesamt beeinträchtigt und verliert dadurch an Aussagekraft.

3.2.7. Einfluss von IL-4 und PGE_2 auf den Calciuminflux in humanen DC

Im humanen System sollte nicht nur die Abhängigkeit des Ca^{2+}-Fluxes von der IL-4-induzierten Rezeptormodulation untersucht werden sondern auch der Einfluss von PGE_2 auf diesen Prozess. In den Abbildungen 39A und 39B sind die Reaktionsverläufe der Ca^{2+}-Freisetzung in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimuli in humanen Monozyten, die drei Tage mit und ohne IL-4 und mit und ohne PGE_2 kultiviert wurden, dargestellt.
Wie auch bei den murinen DC war hier eine Verringerung der Ca^{2+}-Freisetzung bei den Zellen, die der IL-4-Wirkung ausgesetzt waren, zu verzeichnen. Die Resultate für die Ansätze mit PGE_2 waren weniger klar. Der Ca^{2+}-Flux in diesen Zellen durch die Stimulation mit C5a war sehr prägnant. Der Ca^{2+}-Einstrom erwies sich als kongruent mit der erhöhten Expression des C5aR als auch mit dem gesteigerten Migrationsverhalten *in vitro* in Richtung des C5a Gradienten.
Die Ca^{2+}-Messung der mit PGE_2 kultivierten Zellen gegen MIP-1α demonstrierte einen ähnlichen Verlauf wie die gegen C5a. Aber bezogen auf CCR5 widerspricht sie ebenso den FACS-Ergebnissen wie die *in vitro* Migrationsrate, d.h. trotz der drastischen Abnahme von CCR5 unter dem Einfluss von PGE_2 war hierbei gleichzeitig die stärkste Zellreaktion auf den Liganden MIP-1α zu beobachten. Abermals könnte man eine gesteigerte CCR1-vermittelte Aktivität oder einen unbekannten MIP-1α-Rezeptor vermuten.
Alle Ca^{2+}-Messungen im humanen System waren signifikant (Abb. 40A, 40B). Die Zeitpunkte der Stimuluszugabe sind durch Pfeile (Mediatorenzugabe nach 20 sec, Ionomycinzugabe nach 4 min) gekennzeichnet. Der Messzeitraum betrug 5 min. Ionomycin

initiierte den Ausstrom der gesamten Calciummenge aus den intrazellulären Speichern, so dass ein zuverlässiger Vergleich mit dem Calciumsignal der eingesetzten Mediatoren C5a und MIP-1α möglich war.

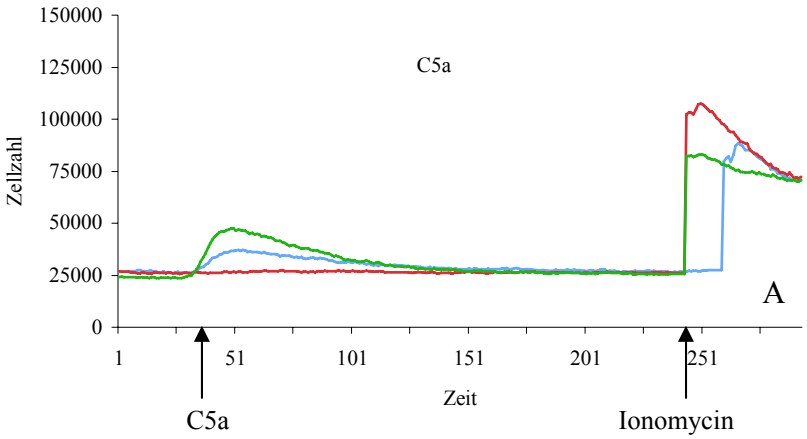


Abb. 39A: Reaktionsverlauf Calciummessung gegen C5a bei Leukapheresezellen nach drei Tagen Kultivierung mit GM-CSF (blau), GM-CSF/IL-4 (rot) und GM-CSF/IL-4/PGE_2 (grün). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=3

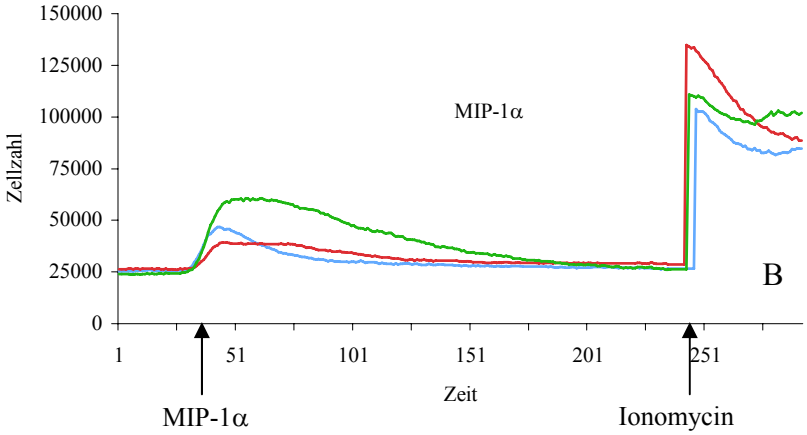


Abb. 39B: Reaktionsverlauf Calciummessung gegen MIP-1α bei Leukapheresezellen nach drei Tagen Kultivierung mit GM-CSF (blau), GM-CSF/IL-4 (rot) und GM-CSF/IL-4/PGE_2 (grün). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von n=6

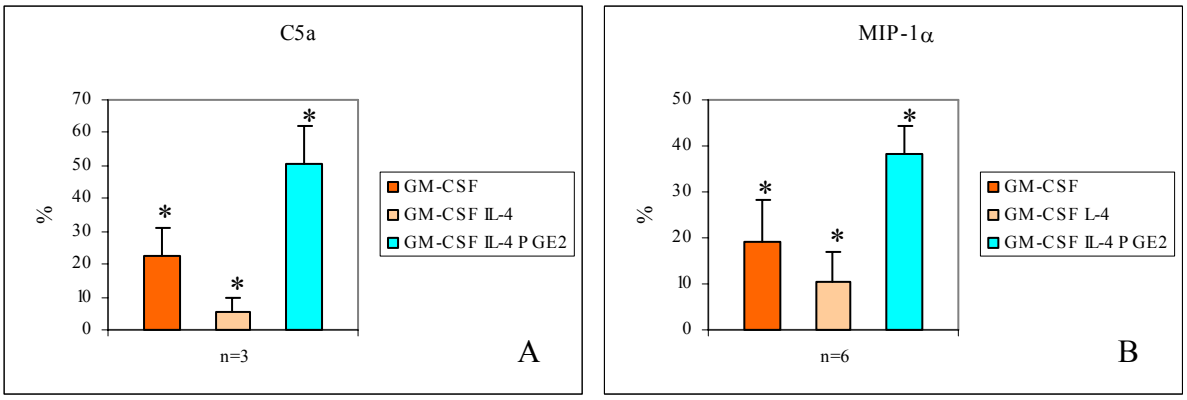


Abb. 40: IL-4 beeinträchtigt die Ca^{2+}-Freisetzung unter dem Einfluss verschiedener Chemotaxine in Leukapheresezellen, die drei Tage kultiviert wurden. (A) C5a 10 ng/ml (n=3), (B) MIP-1α 1000 ng/ml (n=6). Die Mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. ∗p<0,05

4. DISKUSSION

Um Antigene aufnehmen und prozessieren und sie dadurch Lymphozyten präsentieren zu können, müssen DC an den Orten von Infektion, Entzündung und Trauma einwandern und dort akkumulieren (CAUX *et al*., 2000). Da die *in vivo* Wirkung von IL-4 auf das Wanderungsverhalten der DC noch weitgehend ungeklärt ist, besteht ein großes Interesse an der Aufklärung des Zusammenspiels dieses TH2-Cytokins mit antigenpräsentierenden Zellen. Dies ist vor allem im Hinblick auf den Einsatz von DC, die *in vitro* mit IL-4 aus Monozyten generiert wurden, gegen maligne Tumore in Patientenstudien von Bedeutung. Es muss hierbei gewährleistet sein, dass die applizierten Abwehrzellen ihren biologischen Funktionen in gewünschter Weise gerecht werden. SORURI *et al*. (2003A) konnten beobachten, dass IL-4 die chemotaktischen Fähigkeiten von murinen DC, die aus $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen *in vitro* generiert wurden, in Richtung C5a beeinflusst (SORURI *et al*., 2003 A). Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass IL-4 einen negativen Einfluss auf die CCR6 Expression und Funktion hat (CARRAMOLINO *et al*., 1999; DIEU-NOSJEAN *et al*., 2001). In der vorliegenden Studie war der Einfluss von IL-4 und IL-13 und die regulatorische Funktion von PGE_2 auf Monozyten, DC und Makrophagen im humanen und murinen System Gegenstand des Interesses.

4.1. Expression und Funktionalität von Chemotaxinrezeptoren im murinen System

Das TH2-Cytokin IL-4 verringerte die chemotaktische Reaktivität von murinen DC, die aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks generiert wurden. Die Wanderungsfähigkeit dieser Zellen gegen diverse inflammatorische Mediatoren, wie die Chemokine MIP-1α, MCP-1, MDC, MIP-3α, das bakterielle Peptid fMLP, das antimikrobielle Peptid LL-37 und die Anaphylatoxine C3a und C5a, wurde gehemmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-13 seine Wirkung in ähnlicher Art und Weise entfaltetet wie IL-4. Die funktionelle Überlappung von IL-4 und IL-13 reflektiert deren gemeinsame Nutzung der Rezeptorkomponente IL-4Rα.

Bemerkenswerterweise waren die Aktivitäten von IL-4 und IL-13 nicht auf DC beschränkt. Die Mobilisierung von murinen Makrophagen, die ebenfalls aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks generiert wurden, gegen ausgesuchte Chemotaxine wurde in gleicher Weise beeinflusst wie die Migrationsfähigkeit der murinen DC. Die Erklärung für

die beobachtete Wanderungsdefizienz ist in der Reduktion der Expression der Chemotaxinrezeptoren C5aR, C3aR, CCR2 und CCR5 zu sehen. Durch die Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern konnte die Abnahme dieser Oberflächenproteine nachgewiesen werden.

Knockout Mäuse, die kein IL-4 (KUHN *et al*., 1991) bzw. keinen IL-4 Rezeptor (NOBEN-TRAUTH *et al*., 1997) exprimieren, und Mäuse, denen das spezifische Substrat der Signaltransduktion des IL-4 Rezeptors, das STAT6, fehlt (SHIMODA *et al*., 1996, KAPLAN *et al*., 1996; AKIRA, KISHIMOTO, 1997), sind nicht in der Lage in ausreichendem Umfang IgE zu bilden. IL-4-Rezeptor-knockout Mäuse (NOBEN-TRAUTH *et al*., 1997) und STAT6-knockout Mäuse (AKIRA, S., KISHIMOTO, T., 1997) entwickeln keine IL-4-produzierenden T-Zellen, wenn sie mit parasitischen Helminthen infiziert werden, da IL-4 unter physiologischen Bedingungen an der Entwicklung einer effektiven Immunantwort gegen Helminthen und andere extrazelluläre Parasiten beteiligt ist. Es zeigte sich am Beispiel der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR und der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5, dass der Transkriptionsfaktor STAT6 unverzichtbar ist für die IL-4-induzierte Rezeptorverringerung. Bemerkenswerterweise sind nicht nur Antikörperproduktion und IL-4-Produktion von STAT6 abhängig sondern auch die Regulation der untersuchten Chemotaxinrezeptoren.

Die Beteiligung eines PI3K-Isoenzyms an der IL-4-induzierten Signaltransduktion konnte durch den Einsatz von Signalmolekülinhibitoren verifiziert und andere wie MAPK ausgeschlossen werden. Einige frühere Studien mit Wortmannin und LY294002 beschrieben die Hemmung der Wanderungsfähigkeit gegen fMLP. Genau wie Anaphylatoxine, wirkt auch fMLP über G-Protein-gekoppelte Serpentinrezeptoren. DEL PRETE *et al*. (2004) konnten zeigen, dass sowohl unreife als auch reife PI3Kγ-/- murine DC in ihrer Wanderungsfähigkeit gegen die inflammatorischen Chemokine CCL3 (MIP-1α) und CCL5 (RANTES) bzw. gegen das konstitutive Chemokin CCL19 stark eingeschränkt waren. PI3Kγ spielt damit eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten sowohl an Orte von Entzündung und Infektion als auch in Richtung der sekundären Lymphorgane (HIRSCH *et al*., 2000; LI *et al*., 2000). Passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie wurde schon von DAI *et al*. gezeigt, dass IL-4 die Expression des murinen Formylpeptidrezeptor-1 auf der mRNA-Ebene durch einen STAT6-abhängigen Mechanismus in Makophagen, die durch die Verwendung von Thyoglycolat gewonnen wurden, hemmt (DAI *et al*., 2005). Weiterhin werden STAT6 und PI3K für die IL-4-induzierte Herunterregulierung von c-Kit (Stemm Cell Factor Receptor) auf Mastzellen benötigt (MIRMONSEF *et al*., 1999).

Klassischerweise wird die IL-4-induzierte Signalgebung in zwei Hauptwege unterteilt: JAK-STAT-Weg und IRS-1/2-PI3K-Weg. Die Rolle eines dritten Hauptsignalweges mit Beteiligung von MAPK bleibt kontrovers. Zwei Mitglieder der MAPK Familie, nämlich p38 MAPK und JNK, werden durch eine Reihe von hämatopoetischen Cytokinen wie IL-2, IL-3, IL-7, G-CSF und Erythropoetin aktiviert. IL-4 scheint zwischen den wachstumsauslösenden Cytokinen eine Ausnahme zu sein und zeigt keine Beteiligung von JNK oder p38 MAPK an der Aktivierung von Mastzellen. Obwohl die Stimulierung von p38 MAPK durch IL-4 in murinen Pro-B-Zellen BA/F3 gezeigt werden konnte, wird p38 in der humanen B-Zell-Line RAMOS 2G6 nicht aktiviert. Es gibt eine Reihe von Genen, die unabhängig von STAT6 und PI3K durch IL-4 reguliert werden. Am besten bekannt ist hierbei der Suppressor für Cytokinsignaling (SOCS) 3. Die Hochregulierung der SOCS3 Expression in murinen B-Zellen durch IL-4-Stimulation ist abhängig von der Aktivität von p38 MAPK und JNK. Außerdem wird p38 MAPK direkt und schnell STAT6-unabhängig von IL-4 aktiviert. Die Blockade dieser Wege ist möglich durch die Verwendung des JNK Inhibitors II (SP600125) bzw. p38 MAPK Inhibitors (SB203580) (CANFIELD *et al*., 2005).

4.2. Expression und Funktionalität von Chemotaxinrezeptoren im humanen System

Es ist unumstritten, dass IL-4 die Expression und Funktion des Chemokinrezeptors CXCR4 in humanen Monozyten hemmt (CREERY *et al*., 2006; WANG *et al*., 1998, WANG *et al*., 2001), aber es existieren kontroverse Resultate hinsichtlich der IL-4-Wirkung auf CCR5 (WANG *et al*., 1998A; CREERY *et al*., 2006). Beide Oberflächenproteine sind HIV-Corezeptoren. In der vorliegenden Studie wird der negative Effekt von IL-4 auf CCR5, CCR1 und CCR2 auf kultivierten Monozyten und deren Chemotaxis *in vivo* gegen MIP-1α und MCP-1 demonstriert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-4 die Rekrutierung von DC, die aus Monozyten generiert wurden, in Richtung MIP-1α und MCP-1 behindert. Die Kultivierung mit IL-4 führte nur zur Reduktion der Expression von CCR2, aber nicht zur Abnahme von CCR1 und CCR5 auf diesen Zellen.

Humane MoDC als auch Monozyten waren in der Lage gegen C5a zu wandern. Die Zellen konnten auch nach der Kultivierung mit IL-4 in den Peritonealraum der Versuchstiere migrieren, auch wenn dieser Prozess aufgrund der starken Herunterregulierung des C5aR erheblich verzögert war. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass IL-4 die Funktion als auch die Expression der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR auf monozytengenerierten

DC behindert (SORURI *et al*., 2003A). Weiterhin gelang SORURI *et al*. durch die Isolierung und durchflusszytometrische Analyse der eingewanderten Zellen der Nachweis, dass diese sich innerhalb von 24 bis 48 Stunden zu reifen DC differenzierten, die neben der Expression DC-typischer Oberflächenmarker (HLA-DR, CD86, CD83 und CCR7) große Mengen an TNF-α produzierten (SORURI *et al*., 2003B).

YANG *et al*. (2000) konnten zeigen, dass nicht nur unreife sondern auch reife DC den C5aR exprimieren. Für unreife DC ist dies nicht unbedingt überraschend, da C5a als Entzündungsmediator unterschiedlichste Immunzellen anlocken kann. Ungewöhnlich erschien jedoch die Tatsache, dass der C5aR auf reifen DC vorhanden sein soll, da diese Zellen eigentlich nur Rezeptoren für konstitutive (nicht-inflammatorische) Chemotaxine benötigen, damit sie zur Antigenpräsentation in die lymphatischen Organe einwandern können (SALLUSTO *et al*., 1998; CHAN *et al*. 1999; SOZZANI *et al*. 1998). Obwohl es offensichtlich ist, dass die Modulation der Expression der chemotaktischen Rezeptoren für die Regulierung der Migrationseffizienz von DC wichtig ist, könnten aber auch andere Mechanismen wie die funktionelle Entkopplung von Chemokinrezeptoren greifen. Dies wurde bereits bei IL-10 und Vitamin-D3-behandelten DC beobachtet (D´AMICO *et al*., 2000; GAUZZI *et al*., 2005). Zukünftige Studien haben diesen Sachverhalt zu klären.

Der Einfluss von IL-4 und IL-13 auf Makrophagen kann als alternative Aktivierung angesehen werden, welche die Induktion der Expression von MHC Klasse II und Mannoserezeptor als auch die Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Cytokine beinhaltet (GORDON *et al*., 2003). Die Daten der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass eine Hemmung der Mobilisierung gegen eine Vielzahl von inflammatorischen Chemotaxinen wie Chemokine, Anaphylatoxine, antmikrobielle Peptide und N-Formylpeptide ein integrales Merkmal der alternativen Aktivierung von Makrophagen ist, aber nicht auf diesen Zelltyp beschränkt bleibt.

DC werden in gleicher Weise durch IL-4 und IL-13 beeinflusst. Bemerkenswerterweise spielt IL-4 als Schlüsselcytokin für die Bildung der TH2-Effektorzellen aus naiven T-Zellen eine zentrale Rolle in der Generierung von DC *in vitro*, wenn Monozyten als DC-Vorläuferzellen genutzt werden (SALLUSTO *et al*., 1994; ROMANI *et al*., 1994). Es könnte angenommen werden, dass IL-4 die Expression von Anaphylatoxinrezeptoren inhibiert, weil diese zu TH1-assoziierten Chemotaxinrezeptoren gehören. Zumindest der C5a Rezeptor scheint ein solcher Chemotaxinrezeptor zu sein. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Blockade von C5aR zur Hemmung der Bildung von IL-12, einem TH1-Cytokin, führt (KARP *et al*., 2000). Die Resultate dieser Studie lassen vermuten, dass IL-4-behandelte DC

möglicherweise nicht die migratorischen DC repräsentieren, die *in vivo* in den Entzündungsherd migrieren, da ihre Kapazität gegen inflammatorische Stimuli zu wandern allgemein gestört ist.

4.3. Der Einfluss von Prostaglandin E_2 auf Chemotaxinrezeptoren im humanen System

Ein anderes Molekül mit DC-modulierender Aktivität ist PGE_2. In Makrophagen und DC induziert PGE_2 die Bildung von IL-10 und verringert die Expression von Chemokinen und Cytokinen, inklusive IL-12, die eine TH1-Antwort charakterisieren. Die Polarisierung der naiven T-Zellen erfolgt zugunsten der TH2-Antwort (HARRIS *et al*., 2002; HARIZI *et al*., 2006; TAKAYAMA *et al*., 2002; JING *et al*., 2003). Es wird angenommen, dass PGE_2 generell ein unverzichtbarer Faktor für die Entwicklung von migratorischen, aus Monozyten generierten DC *in vivo* darstellt, da die Wanderung gegen CCL21 (6Ckine), CXCL12 (SDF-1) und C5a *in vitro* strickt abhängig ist von der Anwesenheit von PGE_2, aber es wird kein offensichtlicher Effekt auf die Rezeptormenge durch den Einfluss von PGE_2 beobachtet (LEGLER *et al*., 2006). Die monozytengenerierten DC, die durch LEGLER *et al*. beschrieben wurden (LEGLER *et al*., 2006), zeigten Merkmale wie das Fehlen der mRNA des fMLP-Rezeptors und den Mangel an C5aR auf der Zelloberfläche begleitet von einer fehlenden Ansprechbarkeit gegen fMLP und C5a. Diese von LEGLER *et al*. beschriebenen DC-Merkmale stimmen allerdings nicht mit anderen veröffentlichten Daten überein (SOZZANI *et al*., 1995; SALLUSTO *et al*., 1998; WEINMAN *et al*., 2003; KIRCHHOFF *et al*., 2001; SORURI *et al*., 2003A; YANG *et al*., 2000).

Die Bemühungen zur detaillierteren Untersuchung des Sachverhaltes enthüllten, dass PGE_2 ein Gegenspieler von IL-4 ist, da es die C5a-induzierte Chemotaxis von mit IL-4 behandelten Monozyten und monozytengenerierten DC *in vivo* deutlich verbessert und parallel dazu den C5aR stark hochreguliert. In Abwesenheit von IL-4 zeigte PGE_2 keinen Effekt auf den C5aR. Diese Daten stimmen überein mit den Ergebnissen von WEINMAN *et al*. (WEINMAN *et al*., 2003). Sie demonstrierten, dass PGE_2 den C5aR auf DC, die *in vitro* mit IL-4 aus Monozyten generiert wurden, hochreguliert und ebenso als Gegenspieler der TNF-α-induzierten Herunterregulierung während der Reifung der DC fungiert.

Zur Unterstützung der Hypothese, dass PGE_2 die DC-Mobilisierung durch Regulierung der Expression der chemotaktischen Rezeptoren beeinflusst, konnte in der vorliegenden Studie eine leichte Herunterregulierung von CCR1, aber eine dramatische Abnahme der Menge von

CCR5 auf der Oberfläche von monozytengenerierten DC *in vitro* durch PGE_2 verzeichnet werden. Parallel zur verringerten CCR5 Expression war auch die *in vivo* Wanderung dieser Zellen gegen MIP-1α beeinträchtigt. Passend zu diesen Ergebnissen wurde die essentielle Rolle von PGE_2 in der LPS-induzierten Herunterregulierung von inflammatorischen Chemokinrezeptoren und der damit verbundenen chemotaktischen Funktion der DC von CHEN *et al*. postuliert (CHEN *et al*., 2004).

Der negative Effekt von PGE_2 auf die CCR1- und CCR5-Expression und -Funktion war nicht auf die aus Monozyten generierten DC beschränkt, sondern auch auf Monozyten selbst nachzuweisen. Der additive Effekt von IL-4 und PGE_2 auf die Abnahme der Expression von CCR5 führte zu einer nahezu totalen Eliminierung dieses Rezeptors von der Zelloberfläche. PGE_2 allein löste einen solch dramatischen Effekt nicht aus. In zwei vorangegangenen Studien wurde eine PGE_2-induzierte Hemmung der CCR5-Expression und -Funktion für Monozyten bereits beschrieben (THIVIERGE *et al*., 1998; ZEIDLER *et al*., 2000). Im Gegensatz dazu berichteten PANZER *et al*., dass PGE_2 eine höhere funktionelle Ansprechbarkeit gegen RANTES, einen weiteren CCR5-Liganden, induziert trotz der offensichtlichen Abnahme der Expression von CCR5 (PANZER *et al*., 2004). Mögliche Gründe für diese offensichtlichen Diskrepanzen wurden bisher nicht präsentiert. Die Verwendung des SCID-Mausmodells, welches die Untersuchung von Zellwanderung in einem *in vivo* Milieu erlaubt, ermöglichte die eindeutige Bestätigung der Versuchsergebnisse innerhalb des Konzeptes der PGE_2-induzierten Herunterregulierung der CCR5-Expression und -Funktion. Damit gehen die Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Daten von THIVIERGE *et al*. (1998) und ZEIDLER *et al*. (2000) Hand in Hand.

PGE_2 beeinflusst anscheinend nicht nur die Expression von Rezeptoren für Anaphylatoxine und inflammatorische Chemokine, sondern ist ebenfalls essentiell für die Hochregulierung von CCR7 in mit LPS gereiften DC, die aus Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 *in vitro* generiert wurden (CHEN *et al*., 2004). Es wurde bereits postuliert, dass PGE_2 auf DC die Sensitivität von CCR7 für seine Liganden CCL19 und CCL21 verbessert ohne die Höhe der CCR7-Expression signifikant zu modulieren (SCANDELLA *et al*., 2002; SCANDELLA *et al*., 2004; LUFT *et al*., 2002). Studien haben die Rolle von PGE_2 für die Regulation der Migration von DC in Richtung sekundärer Lymphorgane, den Orten der Produktion der CCR7-Liganden CCL19 (MIP-3β) und CCL21 (6Ckine), aufgezeigt (JONULEIT *et al*., 1997; LEE *et al*., 2002). Im Gegensatz dazu ist PGE_2 für die Anlockung unreifer DC in Richtung anderer Chemokine wie CCL3 (MIP-1α) nicht nötig (CHEN *et al*., 2004). Interessanterweise induziert PGE_2 in Kombination mit TNF-α im SCID-Mausmodell direkt die Differenzierung

von CCR7-negativen Monozyten in CCR7-exprimierende reife DC innerhalb von 2 Tagen (SORURI *et al*., 2003B und Abb. 31). Diese *in vivo* Differenzierung ist mit einem starken Anstieg von TNF-α und PGE_2 im Serum der Mäuse assoziiert. Mittels eines neutralisierenden anti-TNF-α-Antikörpers bzw. des Cyclooxygenase-Inhibitors Indomethacin wiesen SORURI *et al*. nach, dass eine simultane Einwirkung von TNF-α und PGE_2 für die Reifung dendritischer Zellen *in vivo* notwendig ist. Auch durch die MIP-1α induzierte Wanderung von Monozyten konnten diese Zellen in reife DC differenziert werden, wenn TNF-α und PGE_2 exogen in den Peritonealraum der Versuchstiere appliziert wurden (SORURI *et al*., 2003B und Abb. 31).

Die Ergebnisse der Studie bestätigen zusammen mit den Resultaten von SORURI *et al*. die Hypothese, dass PGE_2 ein potenter Modulator der Expression von chemotaktischen Rezeptoren ist (SORURI *et al*., 2003B). Durch die Nutzung des *in vivo* Modells, welches als Ersatz für die langwierigere Kultivierung von Monozyten mit GM-CSF und IL-4 *in vitro* diente, wurde überraschenderweise herausgefunden, dass der C5aR von der Oberfläche der Monozyten verschwindet wenn diese sich rapide zu DC differenzieren. Dies ist der gegenteilige Effekt von PGE_2 auf die C5aR-Expression von DC, die *in vitro* aus Monozyten generiert wurden. Die komplexe Rolle von PGE_2 wird weiterhin reflektiert durch seine regulierende Wirkung auf die Expression von CD14. Auf konventionellen DC, die *in vitro* aus Monozyten hergestellt werden, verhindert PGE_2 die Abnahme von CD14 durch IL-4 (KALINSKI *et al*., 1997; eigene unveröffentlichte Daten), wohingegen es im SCID-Mausmodell zusammen mit TNF-α die Herunterregulierung von CD14 auf der Oberfläche von differenzierten Monozyten induziert (SORURI *et al*., 2003B und Abb. 31). Die Resultate der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass PGE_2 eine duale Rolle in der Regulierung der Chemotaxis von DC und Monozyten spielt. Erstens könnte es sein, dass PGE_2 zusammen mit IL-4 einen anderen Effekt auf die Expression von inflammatorischen chemotaktischen Rezeptoren *in vitro* hat. Dies würde in der Verringerung von CCR1 und CCR5 und in der Hochregulierung von C5aR münden, mit PGE_2 als Gegenspieler von IL-4. Zweitens könnte PGE_2 als integraler Teil eines entzündlichen Mikromilieus zur schnellen Induktion der DC-Differenzierung aus Monozyten führen. Dies wäre kombiniert mit einer Reduzierung von inflammatorischen chemotaktischen Rezeptoren und einer Hochregulierung von CCR7.

Die Ergebnisse dieser Studie stimmen überein mit der Annahme, dass die Reifung von DC durch unterschiedliche Regulation von Chemokinrezeptorexpression charkterisiert ist (CAUX *et al*., 2000). Weiterhin sollte der C5aR in die Reihe der inflammatorischen chemotaktischen Rezeptoren, die während der DC-Reifung *in vivo* einer Herunterregulierung unterliegen,

aufgenommen werden trotz der Tatsache, dass kontroverse Resultate für die C5aR-Expression bei unreifen versus reifen DC *in vitro* existieren (YANG *et al*., 2000, SALLUSTO *et al*., 1998, KIRCHHOFF *et al*., 2001, WEINMANN *et al*., 2003).

Viele der beobachteten Effekte von PGE_2 auf DC sind mit der Aktivierung der Adenylatcyclase und der daraus resultierenden cAMP-abhängigen Aktivierung der Proteinkinase A verbunden. Aber auch PI3K und die von ihr abhängige Proteinkinase B (Akt) sind involviert (SCANDELLA *et al*., 2004; MEI *et al*., 2002). Da über die Aktionen der Proteinkinase B Überlebens- und Proliferationssignale in Gang gesetzt werden, bedeutet dies, dass über eine EP2/EP4 bedingte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels ein antiapoptotischer Effekt ausgelöst wird. Dieser ist zurückzuführen auf die PGE_2-bedingte Stabilisierung der Mitochondrienmembranen und der signifikanten Expressionsreduktion proapoptotischer Moleküle wie Caspase und Granzyme B. Exogenes PGE_2 ist demnach lokal am Überleben der DC im Entzündungsmilieu beteiligt. Dadurch und durch seinen Einfluss auf die Migration der DC in Richtung sekundärer Lymphorgane stellt PGE_2 einen Initiator der adaptiven Immunität dar (VASSILIOU *et al*., 2004).

Durch die Beteiligung von IL-4, IL-13 und auch von PGE_2 an der Initiierung der TH2-Antwort stehen diese Mediatoren im Fokus der Erforschung TH2-assoziierter Erkrankungen wie Asthma bronchiale und anderer allergischer Prozesse. T-Zell- und IgE-vermittelte Immunantwort sind bekannt als Schlüsselreaktionen von allergischen Vorgängen. Dendritische Zellen sind durch die Antigenprozession die Brücke zwischen Allergenen und T-Zellen. Ein Ungleichgewicht zwischen der TH2- und der TH1-Antwort wird verantwortlich gemacht für die Entstehung von atopischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale. Atopische Patienten zeigen eine erhöhte Menge an IL-4, welches für die Induktion der TH2-Antwort verantwortlich ist. Diese bedingt wiederum die IgE-Produktion. T-Helferzellen sind aber nicht die einzige Quelle für proallergische Cytokine. Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten, T-Killerzellen, Bronchialzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen können inflammatorische Moleküle produzieren. Die Mediatoren IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 werden vom 5q Cytokincluster codiert (MALERBA, PIGNATTI, 2005).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Myeloide Dendritische Zellen dienen als Vermittler zwischen angeborener und erworbener Immunität. Sie migrieren zum Ort der Entzündung, phagozytieren dort Antigene und wandern als akzessorische Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten,

wo sie T-Lymphozyten prozessierte Antigene präsentieren und durch Kostimulation die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten initiieren. Voraussetzung für die Funktionen der DC ist deren Wanderungsfähigkeit in Richtung chemotaktischer Mediatoren wie Chemokine und Anaphylatoxine, deren chemotaktische Eigenschaften über spezifische G-Protein-gekoppelte Serpetinrezeptoren vermittelt werden. Durch das die Zellen umgebende Cytokinmikromilieu erfolgt die Regulation der Rezeptoren. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch in großen Teilen ungeklärt und bedürfen weiterer detaillierter Forschung. Obwohl Monozyten sich *in vitro* durch die Zugabe von GM-CSF und IL-4 in DC differenzieren können, sind die Bedingungen, die *in vivo* zur DC-Entstehung führen noch weitgehend unbekannt. So spielt IL-4 zumindest *in vitro* eine herausragende Rolle und ist gegenwärtig für die Generierung von DC *in vitro* unverzichtbar (SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994). Die Entwicklung von DC *in vitro* aus $CD14^+$ Monozyten oder $CD34^+$ Vorläuferzellen eröffnet die Möglichkeit zur Gewinnung größerer Mengen dieser antigenpräsentierenden Zellen. MoDC unter Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 entsprechen in ihren Funktionen unreifen DC. Durch den Einsatz von IL-4 als Wachstumsfaktor für DC ist deren Verwendung für experimentelle als auch für klinische Zwecke möglich. Dies birgt die Hoffnung zur erfolgreichen Therapie von malignen Tumoren. Es gibt eine große Anzahl an Studien zur Tumorimmunität in Tiermodellen, in denen DC *in vitro* mit tumorassoziierten Antigenen beladen wurden und in der Lage waren, eine Abwehrreaktion gegen den Tumor *in vivo* auszulösen. Unter dem Strich lassen diese Studien erkennen, dass die Vaccinierung mit definierten Populationen von *in vitro* generierten DC nach ihrer *ex vivo* Beladung mit Tumorantigenen in einer effektiven Antitumorimmunantwort münden könnte (SORURI, ZWIRNER, 2005). PGE_2 und IL-4 sind an der Reifung von Dendritischen Zellen und an der Modulation ihrer Migration beteiligt. In der vorliegenden Studie wurde demonstriert, dass IL-4 und auch IL-13 die Wanderungsfähigkeit von murinen DC und Makrophagen gegen verschiedene inflammatorische Mediatoren wie die Chemokine MIP-3α, MIP-1α, MCP-1, MDC, aber auch gegen die Peptide fMLP und LL-37 und die Anaphylatoxinen C5a und C3a beeinflussen. Ergänzend dazu konnten eine STAT6- und PI3K-abhängige Reduktion der Expression von C5aR, C3aR, CCR2 und CCR5 festgestellt werden. IL-4 behinderte ebenfalls die Chemotaxis von human Monozyten und monozytengenerierten DC gegen MIP-1α und MCP-1. Es regulierte die Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 auf Monozyten herunter. Auf MoDC verringerte sich die CCR2 Menge ebenfalls, aber nicht die von CCR1 und CCR5. Der negative Einfluss von IL-4 auf die Migrationsfähigkeit von monozytengenerierten Zellen gegen MIP-1α wurde verbessert durch PGE_2 obwohl dieser

Mediator die Oberflächenexpression von CCR1 und CCR5 vermindert. Im Gegensatz dazu tritt PGE_2 als Gegenspieler der IL-4-induzierten Abnahme der C5aR Expression und Funktion bei monozytengenerierten DC und Monozyten auf. PGE_2 beseitigt *in vivo* die C5aR-Expression auf Monozyten während es die schnelle Differenzierung dieser Zellen zu reifen CCR7-exprimierenden DC im SCID-Mausmodell in Kombination mit TNF-α vorantreibt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die TH2-Cytokine IL-4 und IL-13 allgemein die Kapazität von DC und Monozyten/Makrophagen gegen Chemokine, Anaphylatoxine, formyl- und antimikrobieller Peptide zu wandern, kompromittieren, hingegen PGE_2 eine komplexe Rolle in der Regulation der DC Chemotaxis durch differenzierte Beeinflussung der Expression chemotaktischer Rezeptoren spielt.

6. LITERATURQUELLEN

- AABAKKEN, L., DYBDAHL, J. H., EIDSAUNET, W., HAALAND, A., LARSEN, S., OSNES, M., 1989: Optimal assessment of gastrointestinal side effects induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: endoscopic lesions, faecal blood loss, and symptoms not necessarily correlated, as observed after naproxen and oxindanac in healthy volunteers. Scand. J. Gastroenterol. 24: 1007 - 1013
- AKIRA, S., KISHIMOTO, T., 1997: NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. Adv. Immunol. 65: 1 - 46
- ALLAVENA, P., SICA, A., VECCHI, A., LOCATI, M., SOZZANI, S., MANTOVANI, A., 2000: The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. Immunol. Rev. 177: 141 - 149
- ALVARO-GRACIA, J. M., ZVAIFLER, N. J., FIRESTEIN, G. S., 1989: Cytokines in chronic inflammatory arthritis. IV. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor mediated induction of class II MHC on human monocytes: A possible role in rheumatoid arthritis. J. Exp. Med. 170: 865 - 875
- AMAN, M. J., TAYEBI, N., OBIRI, N. J., PURI, R. K., MODI, W. S. LEONARD, W. J., 1996 : cDNA cloning and characterization of the human interleukin-13 receptor alpha chain. J. Biol. Chem. 271 (46): 29265 - 29270
- BAGGIOLINI, M., DEWALD, B., MOSER, B., 1997: Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 15: 675-705
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBEQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B., PALUCKA, K., 2000: Immunobiology of Dendritic Cells. Annu. Rev. Immunol. 18: 767 - 811
- BANCHEREAU, J., STEINMAN, R. M., 1998: Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 392 (19): 245 - 252
- BENNETT, B. L., CRUZ, R., LACSON, R. G., MANNING, A. M., 1997: Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. J. Biol. Chem. 272: 10212 - 10219
- BJERKE, S., GAUDERNACK, G., 1985: Dendritic cells and Monocytes as Accessory Cells in T-Cell Responses in Man. Scand. J. Immunol. 21: 501 - 508
- BOISE, L. H., MINN, A. J., JUNE, C. H., LINDSTEN, T., THOMPSON, C. B., 1995: Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell devision. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5491 – 5495

- BOULAY, F., MERY, L., TARDIF, M., BROUCHON, L., VIGNAIS, P., 1991: Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on the differentiated HL-60 cells. Biochemistry 30: 2993 - 2999

- BURGESS, A. W., METCALF, D., 1980: The nature and action of granulpcyte-macrophage colony stimulating factors. Blood 56: 947 - 958

- CANFIELD, S., YOUNGNAM, L., SCHRÖDER, A., ROTHMAN, P., 2005: Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK. J. Immunol., 174: 2494 - 2498

- CARRAMOLINO, L., KREMER, L., GOYA, I., VARONA, R., BUESA, J. M., GUTIERREZ, J., ZABALLOS, A., MARTINEZ-A, C., MARQUEZ, G., 1999: Down-regulation of the beta-chemokine receptor CCR6 in dendritic cells mediated by TNF-alpha and IL-4. J. Leukoc. Biol. 66: 837 - 844

- CAUX, C., AIT-YAHIA, S., CHEMIN, K., de BOUTEILLER, O., DIEU-NOSJEAN, M. C., HOMEY, B., MASSACRIER, C., VANDERVLIET, B., ZLOTNIK, A., VICARI, A., 2000 : Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. Springer Semin. Immunopathol. 22 (4): 345 - 369

- CAUX, C., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., SCHMITT, D., BANCHEREAU, J., 1992: GMCSF and TNFα cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. Nature 360: 258 - 261

- CHATILA, T. A., 2004: Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. Trends in Molecular Medicine 10: 493 - 499

- CHATTERJEE-KISHORE, M., van den ACKER, F., STARK, G. R., 2000: Association of STATs with relatives and friends. Trends Cell. Biol. 10: 106 - 111

- CHAN, V.W., KOTHAKOTA, S., ROHAN, M. C., PANGANIBAN-LUSTAN, L., GARDNER, J. P., WACHOWICZ, M. S., WINTER, J.A., WILLIAMS, L. T., 1999: Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. Blood 93: 3610 - 3616

- CHEN, X. H., PATEL, B., K., WANG, L. M., FRANKEL., M., ELLMORE, N., FLAVELL, R. A., LaROCHELLE, W. J., PIERCE, J. H., 1997: Jak-1 expression is required for mediating interleukin-4-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate and STAT6 signaling molecules. J. Biol. Chem. 272: 6556 - 6560

- CHEN, T., GUO, J., YANG, M., HAN, C., ZHANG, M., CHEN, W., LIU, Q., WANG, Y., CAO, X., 2004: Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression. Blood 103: 413 - 421

- CHENOWETH, D. E., GOODMAN, M. G., HUGLI, T. E., 1978: Demonstration of specific C5a receptors on intact human polymorphonuclear leukocytes. Proc Natl Acad Sci USA 75: 3943-3947

- COFFMAN, R. L., OHARA, J., BOND, M. W., CARTY, J., ZLOTNIK, A., PAUL, W. E., 1986: B cell stimulation factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. J. Immunol. 136: 4538 - 4541

- CREERY, D., WEISS, W., GRAZIANI-BOWERING, G., KUMAR, R., AZIZ, Z., ANGEL, J. B., KUMAR, A., 2006: Differential regulation of CXCR4 and CCR5 expression by interleukin (IL)-4 and IL-13 is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency Virus (HIV) type 1 replication but not HIV entry into human monocytes.Viral. Immunol. 19: 409 – 423

- CYSTER, J. G., 1999: Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell araes of lymphoid organs. J. Exp. Med. 3: 447 - 450

- DAI, Y., MAJOR, J., NOVOTNY, M., HAMILTON, T. A., 2005: IL-4 inhibits expression of the formyl peptide receptor gene in mouse peritoneal macrophages. J. Interferon Cytokine Res. 25: 11 - 19

- D´AMICO, G., FRASCAROLI, G., BIANCHI, G., TRANSIDICO, P., DONI, A., VECCHI, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A., 2000: Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. Nature Immunology 1: 387 - 391

- DANCESCU, M., RUBIO-TRUJILLO, M., BIRON, G., BRON, D., DELESPESSE, G., SARFATI, M., 1992: Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. J. Exp. Med. 176: 1319 - 1326

- DARNELL, J. E., 1997: STATs and gene regulation. Science 277: 1630 - 1635

- DAVID, M., CHEN, H. E., GOELZ, S., LARNER, A. C., NEEL., B. G., 1995: Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/STAT pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. Mol. Cell. Biol. 15: 7050 - 7058

- DAWSON, C. H., BROWN, B. L., DOBSON, P. R., 1997: A 70-kDa protein facilitates interleukin-4 signal transduction in the absence of the common gamma receptor chain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 233 : 279 – 282

- DEL PRETE, A., VERMI, W., DANDER, E., OTERO, K., BARBERIS, L., LUINI, W., BERNASCONI, S., SIRONI, M., SANTORO, A., GARLANDA, C., FACCHETTI, F., WYMANN, M. P., VECCHI, A., HIRSCH, E., MANTOVANI, A., SOZZANI, S., 2004: Defective dendritic cell

migration and activation of adaptive immunity in PI3Kγ-deficient mice. EMBO 23: 3505 - 3515

- DHAND, R., HARA, K., HILES, I., BAX, B., GOUT, I., PANAYOTOU, G., FRY, M. J., YONEZAWA, K., KASUGA, M., WATERFIELD, M. D., 1994: PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions EMBO J. 13: 511 - 521

- DIEU, M. C., VANDERVLIET, B., VICARI, A., BRIDON, J. M., OLDHAM, E., AIT-YAHIA, BRIERE, F., ZLOTNIK, A., LEBEQUE, S., CAUX, C., 1998: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J. Exp. Med. 188: 373 - 386

- DIEU-NOSJEAN, M. C., VICARI, A., LEBEQUE, S., CAUX, C., 1999: Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. J Leukoc Biol 66: 252 - 256

- DIEU-NOSJEAN, M. C., MASSACRIER, C., VANDERVLIET, B., FRIDMAN, W. H., CAUX, C., 2001 : IL-10 induces CCR6 expression during Langerhans cell development while IL-4 and IFN-gamma suppress it. J. Immunol. 167: 5594 - 5602

- DURONIO, V., WELHAM, M. J., ABRAHAM, S., DRYDEN, P., SCHRADER, J. W., 1992: p21ras activation via hemopeoietin receptors and c-kit requires tyrosin kinase activity but not tyrosin phoshphorylation of p21ras GTPase-activating protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1587 - 1591

- EHRET, G. B., REICHENBACH, P., SCHINDLER, U., HORVATH, C. M., FRITZ, S., NABHOLZ, M., BUCHER, P., 2001: DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. J. Biol. Chem. 276: 6675 - 6688

- ENDO, T. A., MASUHARA, M., YOKOUCHI, M, SUZUKI, R., SAKAMOTO, H., MITSUI, K., MATSUMOTO, A., TANIMURA, S., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAZAKI, T., LEONOR, N., TANIGUCHI, T., FUJITA, T., KANAKURA, Y, KOMIYA, S., YOSHIMURA, A., 1997: A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature 387: 921 – 924

- FALASCA, M., HUGHES, W. E., DOMINGUEZ, V., SALA, G., FOSTIRA, F., FANG, M. Q., CAZZOLLI, R., SHEPHERD, P. R., JAMES, D. E., MAFFUCCI, T., 2007: The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. J. Biol. Chem. 282 (38): 28226 - 28236

- FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., VIEIRA, P., MOSMANN, T. R., HOWARD, M., MOORE, K. W., O´GARRA, A., 1991: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by TH1 cells. J. Immunol. 146: 3444 - 3451

- FÖRSTER, R., SCHUBEL, A., BREITFELD, D., KREMMER, E., RENNER-MÜLLER, I., WOLF, E., LIPP, M., 1999: CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. Cell 99: 23 - 33
- FRANKE, T., F., KAPLAN, D. R., CANTLEY, L. C., TOKER, A., 1997: Direct regulation of the Akt proto-oncogen product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. Science 275: 665 - 668
- FRUMAN, D. A., CANTLEY, L. C., 2002: Phosphoinositid 3-kinase in immunological systems. Seminars in Immunology, Vol. 14: 7 - 18
- GASCAN, H., GAUCHAT, J. F., RONCAROLO, M. G., YSSEL, H., SPITS, H., de VRIES, J. E., 1991: Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. J. Exp. Med. 173: 7474 - 750
- GASQUE, P., SINGHRAO, S. K., NEAL, J. W., GÖTZE, O., MORGAN, B. P. 1997: Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. Am J Pathol 150: 31 - 41
- GATELY, M. K., RENZETTI, L. M., MAGRAM, J., STERN, A. S., ADORINI, L., GUBIER, U., PRESKY, D. H., 1998: The IL-12/IL-12-receptor system role in normal and pathologic immune responses. Ann. Rev. Immunol. 16: 495 - 521
- GAUZZI, M. C., PURIFICATO, C., DONATO, K., JIN, Y., WANG, L., DANIEL, K. C., MAGHAZACHI, A. A., BELARDELLI, F., ADORINI, L., GESSANI, S., 2005: Suppressive effect of 1a,25-dihydroxyvitamin D3 on type 1 IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. J. Immunol. 174: 270 - 276
- GERARD, N. P., GERARD, C., 1991: The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. Nature 349: 614 - 617
- GERRARD, T. L., DYER, D. R., MOSTOWSKI, H. S., 1990: IL4 and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor selectively increase HLA-DR and HLA-DP antigens but not HLA-DQ antigens on human monocytes. J. Immunol. 144: 4670 - 4674
- GILROY, D. W., 1999: Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. Nat. Med. 5: 698 - 701
- GLOVSKY, M. M., HUGLI, T. E., ISHIZAKA, T., LICHTENSTEIN, L. M., ERICKSON, B. W., 1979: Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: studies of C3a leukocyte binding and histamine release. J Clin Invest 64: 804 - 811

- GORDON, S., 2003: Alternative activation of macrophages, Nature Reviews 3: 23-35
- GOUGH, N. M., GOUGH, J., METCALF, D., KELSO, A., GRAIL, D., NICOLA, N. A., BURGESS, A. W., DUNN, A. R., 1984: Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoetic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Nature 309: 763 - 767
- GROUX, H., BIGLER, M., de VRIES, J. E., RONCAROLO, M. G., 1998: Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. J. Immunol. 160: 3188 - 3193
- GUNN, M. D., KYUWA, S., TAM, C., KAKIUCHI, T., MATSUZAWA, A., WILLIAMS, L. T., NAKANO, H. 1999: Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. J Exp Med 189: 451 - 460
- GUSTAFSON, T. A., HE, W., CRAPARO, A., SCHAUB, C. D., O´NEILL, T. J., 1995: Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. Mol. Cell. Biol. 15: 2500 - 2508
- HAQUE, S. J., HARBOR, P., TABRIZI, M., YI, T., WILLIAMS, B. R., 1998: Protein-tyrosine phosphatase SHP-1 is a negative regulator of IL-4 and IL-13 dependent signal transduction. J. Biol. Chem. 273 (51): 33893 - 33896
- HARIZI, H., JUZAN, M., GROSSET, C., RASHEDI, M., GUALDE, N., 2001: Dendritic cell issued in vitro from bone marrow produce PGE2 that contributes to the immunmodulation induced antigen-presenting cells. Cell. Immunol. 209: 19 - 28
- HARIZI, H., JUZAN, M., PITARD, V., MOREAU, J.-F., GUALDE, N., 2002: Cyclooxigenase-2-issued prostaglandin E2 enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. J. Immunol. 168: 2255 - 2263
- HARIZI, H., GROSSET, C., GUALDE, N., 2003: Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. J. Leukoc. Biol. 73: 756 - 763
- HARIZI, H., GUALDE, N., 2006: Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. Cellular and Molecular Immunology 3: 271 - 277
- HARRIS, S. G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D., PHIPPS, R. P., 2002: Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 23: 144 - 150
- HERSHEY, G. K., FRIEDRICH, M. F., ESSWEIN, L. A., THOMAS, M. L., CHATILA, T. A., 1997: The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleuki-4 receptor. N. Engl. J. Med. 337: 1720 - 1725

- HILKENS, G. M., SNIJDERS, M. U. A., VERMEULEN, H., MEIDE, P. H. V. D., WIERENGA, E. A., KAPSENBERG, M. L., 1996: Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN-γ level of activated human $CD4^+$ T cells. J. Immunol. 156: 1722 - 1727

- HIRSCH, E., KATANAEV, V. L., GARLANDA, C., AZZOLINO, O., PIROLA, L., SILENGO, L., SOZZANI, S., MANTOVANI, A., ALTRUDA, F., WYMANN, M. P., 2000: Central role for G protein-coupled phosphoinositid 3-kinase gamma in inflammation. Science 287 (5455): 1049 - 1053

- HOWARD, M., FARRAR, J., HILFIKER, M., JOHNSON, B., TAKATSU, K., HAMAOKA, T., PAUL, W. E., 1982: Identification of a T-cell derived B-cell growth factor distinct from interleukin 2. J. Exp. Med. 155: 914 - 923

- HSIEH, C. S., HEIMBERGER, A. B., GOLD, J. S., O´GARRA, A., MURPHY, K. M., 1992: Differential regulation of T-helper phenotype development by interleukin-4 and interleukin-10 in an alpha-beta-T-cell-receptor transgenic system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6065 - 6069

- HUGLI, T. E., 1984: Structure and function of the anaphylatoxins. Springer Semin Immunopathol 7: 193 - 219

- ILLERA, V. A., PERANDONES, C. E., STUNZ, L. L., MOWER, J., IR, D. A., ASHMAN, R. F., 1993: Apoptosis in splenic B lymphocytes: regulation by protein kinase C and IL-4. J. Immunol. 151: 2965 - 2973

- INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S., STEINMAN, R. M., 1992: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte macrophage colony stimulating factor. J. Exp. Med. 176: 1693 - 1702

- JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002

- JANSEN, J. H., WIENTJENS, G. J., FIBBE, W. E., WILLEMZE, R., KLUIN-NELEMANS, H. C., 1989: Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. J. Exp. Med. 170: 577 - 582

- JGIETSEME, J. U., ANANABA, G. A., BOLIER, J., BOWERS, S., MOORE, T., BELAYE, T., EKO, O. F., LYN, D., BLACK, M. C., 2000: Suppression of endogenous IL-10 gene expression in dendritic cells enhances antigen presentaion for specific TH1 induction: potential for cellular vaccine development. J. Immunol. 164: 4212 - 4219

- JING, H., VASSILIOU, E., GANEA, D., 2003: Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. J. Leukocyte Biol. 74: 868 - 879
- JONULEIT, H., KUHN, U., MULLER, G., STEINBRINK, K., PARAGNIK, L., SCHMITT, E., KNOP, J., ENK, A. H., 1997: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur. J. Immunol. 27: 3135 - 3142
- JOZEFOWSKI, S., BOBEK, M., MARCINKIEWICZ, J., 2003: Exogenous but not endogenous prostanoids regulate cytokine secretion from murine bone marrow dendritic cells: EP2, DP, and IP but not EP1, EP3, and FP prostanoid receptors are involved. Int. Immunopharmacol. 3: 865 - 878
- KABASHIMA, K., SAKATA, D., NAGAMACHI, M., MIYACHI, Y., INABA, K., NARUMIYA, S., 2003: Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immun response by promoting migration and maturation of Langerhans cells. Nat. Med. 9: 744 - 749
- KALINSKI, P., HILKENS, C. M., SNIJDERS, A., SNIJDEWINT, F. G., KAPSENBERG, M. L., 1997: IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2 promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. J. Immunol. 159: 28 - 35
- A) KAPELLER, R., CANTLEY, L. C., 1994: Phosphatidyinositol 3-kinase. Bioessays 16: 565 - 576
- B) KAPELLER, R., PRASAD, K. V., JANSSEN, O., HOU, W., SCHAFFHAUSEN, B. S., RUDD, C. E., CANTLEY, L. C., 1994: Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidyinositol 3-kinase. J. Biol. Chem. 269: 1927 - 1933
- KAPLAN, M. H., SCHINDLER, U., SMILEY, S. T., GRUSBY, M. J., 1996: STAT6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of TH2 cells. Immunity 4: 313 - 319
- KAPLAN, G., WALSH, G., GUIDO, L. S., MEYN, P., BURKHARDT, R. A., ABALOS, R. M., BARKER, J., FRINDT, P. A., FAJARDO, T. T., CELONA, R., COHN, Z. A., 1992: Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage colony stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. J. Exp. Med. 175: 1717 - 1728
- KAPLAN, M. H., SCHINDLER, U., SMILEY, S. T., GRUSBY, M. J., 1996: STAT6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of TH_2 cells. Immunity, 4: 313 - 319

- KARP, C. L., GRUPE, A., SCHADT, E., EWART, S. L., KEANE-MOORE, M., CUOMO, P. J., KÖHL, J., WAHL, L., KUPERMAN, D., GERMER, S., AUD, D., PELTZ, G., WILLS-KARP, M., 2000: Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. Nat Immunol 1: 221 - 226
- KASHIWADA, M., GIALLOURAKIS, C. C., PAN, P.-Y., ROTHMAN, P. B., 2001: Immunreceptor tyrosin-based inhibitory motif of the IL-4 receptorassociates with SH2-containing phophatases and regulates Il-4 induced proliferation. J. Immunol. 167: 6382 - 6387
- KEEGAN, A. D., NELMS, K., WHITE, M., WANG, L. M., PIERCE, J. H., PAUL, W. E., 1994: An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. Cell 76: 811 - 820
- KELLY-WELCH, A. E., 2003: Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connection maps. Science 300: 1527 - 1528
- KIRCHHOFF, K., WEINMANN, O., ZWIRNER, J., BEGEMANN, G., GÖTZE, O., KAPP, A., WERFEL, T., 2001: Detection of anaphylatoxin receptors on CD83+ dendritic cells derived from human skin. Immunology 103: 210 - 217
- KIRCHNER, H., KRUSE, A., NEUSTOCK, P., RINK, L., 1994: Cytokine und Interferone. 1. Aufl., Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum
- KLIPPEL, A., ESCOBEDO, J. A., HU, Q., WILLIAMS, L. T., 1993: A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo. Mol. Cell. Biol. 13: 5560 - 5566
- KUHN, R., RAJEWSKY, K., MULLER, W., 1991: Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. Science 254: 707 - 710
- KURODA, E., SUGIURA, T., OKADA, K., ZEKI, K., YAMASHITA, U., 2001: Prostaglandin E2 up-regulates macrophage-derived chemokine production but suppresses IFN-inducible protein-10 production by APC. J. Immunol. 166: 1650 - 1658
- LANGKABEL, P., ZWIRNER, J., OPPERMANN, M., 1999: Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by G protein-coupled receptor kinases. Eur J Immunol 29: 3035 - 3046
- LAUENER, R. P., GOYERT, S. M., GEHA, R. S., VERCELLI, D., 1990: Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. Eur. J. Immunol. 20: 2375 - 2381
- LE, Y., MURPHY, P. M., WANG, J. M., 2002 : Formyl-peptide receptors revisited. Trends Immunol. 23: 541 - 548

- LEE, A. W., TRUONG, T., BICKHAM, K., FONTENEAU, J. F., LARSSON, M., DA SILVA, J., SOMERSAN, S., THOMAS, E. K., BHARDWAJ, N., 2002: A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. Vaccine 20 (Suppl. 4): A8 - A22
- LEFKOWITZ, R. J.. 1998. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and betaarrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem*. 273: 18677 - 18680
- LEGLER, D. F., KRAUSE, P., SCANDELLA, E., SINGER, E., GROETTRUP, M., 2006: Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts is effect via EP2 and EP4 receptors. J. Immunol. 176: 966 - 973
- LEMMON, M. A., FERGUSON, K. M., SIGLER, P. B., SCHLESSINGER, J., 1995: Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10472 - 10476
- LI, Z., JIANG, H., XIE, W., ZHANG, Z., SMRCKA, A. V., WU, D., 2000: Roles of PLC-beta2 and –beta3 and PI3K gamma in chemoattractant-mediated signal transduction. Science 287 (5455): 1046 - 1049
- LIVNAH, O., STURA, E. A., JOHNSON, D. L., MIDLETON, S. A., MULCAHY, L. S., WRIGHTON, N. C., DOWER, W. J. , JOLLIFFE, L., K., WILSON, I. A., 1996: Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 A (see comments). Science 273: 464 - 471
- LUFT, T., JEFFORD, M., LUETJENS, P., TOY, T., HOCHREIN, H., MASTERMAN, K. A., MALISZEWSKI, C., SHORTMAN, K., CEBON, J., MAWASKOVSKY, E., 2002: Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E2 regulates the migratory capacity of specific DC subsets. Blood 100: 1362 - 1372
- LUSTER, A. D., 1998: Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 338: 436 - 445
- LUSTER, A. D., (2001): Chemokines regulate lymphocyte homing to the intestinal mucosa. Gastroenterology 120: 291 - 294
- MACK, M., CIHAK, J., SIMONIS, C., LUCKOW, B., PROUDFOOT, A. E., PLACHY, J., BRUHL, H., FRINK, M., ANDERS, H. J., VIELHAUER, V., PFIRSTINGER, J., STANGASSINGER, M., SCHLONDORFF, D.. 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. J. Immunol. 166: 4697 - 4704.
- MALERBA, G., PIGNATTI, P. F., 2005: A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. J. Appl. Genet. 46 (1): 93 - 104

- McCOLL, S. R., 2002: Chemokines and denritic cells: a crucial alliance. Immunol. Cell Biol 80 (5): 489 - 496

- McWILLIAM, A. S., NAPOLI, S., MARSH, A. M., PEMPER, F. L., NELSON, D. J., PIMM, C. L., STUMBLES, P. A., WELLS, T. N. C., HOLT, P. G., 1996: Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. J Exp Med 184: 2429 - 2434

- MEI, F. C., QIAO, J., TSYGANKOVA, O. M., MEINKOTH, J. L., QUIILIAM, L. A., CHENG, X., 2002: Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. J. Biol. Chem. 277: 11497 - 11504

- METCALF, D., BEGLEY, C. G., JOHNSON, G. R., NICOLA, N. A., VADAS, M. A., LOPEZ, A. F., WILLIAMSON, D. J., WONG, G. G., CLARK, S. C., WANG, E. A., 1986: Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 67: 37 - 45

- MIKITA, T., CAMPBELL, D., WU, P. G., WILLIAMSON, K., SCHINDLER, U., 1996: Requirements for interleuki-4-induced gene expression and functional characterization of STAT6. Mol. Cell. Biol. 16: 5811 - 5820

- MINAMI, Y., KONO, T., YAMADA, K., KOBAYASHI, N., KAWAHARA, A., PERLMUTTER, R. M., TANIGUCHI, T., 1993: Association of p56 (lck) with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2 induced activation of p56 (lck). EMBO J. 12: 759 - 768

- MINSHALL, **C.**, ARKINS, S., STRAZA, J., CONNORS, J., DANTZE, R., FREUND, G. G., KELLEY, K. W., 1997: IL-4 and insulin-like growth factor-1 inhibit the decline in Bcl-2 and promote the survival of IL-3-deprived myeloid progenitors. J. Immunol. 159: 1225 - 1232

- MIRMONSEF, P., SHELBURNE, C. P., YEATMAN, I. I. F., CHONG, H. J., RYAN, J. J., 1999: Inhibition of Kit expression by IL-4 and IL-10 in murine mast cells: role of STAT6 and phosphatidylinositol 3´-kinase. J. Immunol. 163: 2530 - 2539

- MITSUYASU, H., IZUHARA, K., MAO, X.-Q., GAO, P.-S., ARINOBU, Y., ENOMOTO, T., KAWAI, M., SASAKI, S., DAKE, Y., HAMASAKI, N., SHIRAKAWA, T., HOPKIN, J. M., 1998: Ile50Val variant of IL-4Ralpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. Nature Med. 19: 119 - 120

- MIYAJIMA, A., KITAMURA, T., HARADA, N., YOKOTA, T., ARAI, K., 1992: Cytokine receptors and signal transduction. Annu. Rev. Immunol. 10: 295 - 331

- MIYAZAKI, T., KAWAHARA, A., FUJII, H., NAKAGAWA, Y., MINAMI, Y., LIU, Z., OISHI, I., SILVENNOINEN, O., WITTHAHN, B. A., IHLE, J. N. et al., 1994: Functional

activation of Jak1 and Jak3 by selective assiciation with IL-2 receptor subunits. Science 266: 1045 - 1047

- MOORE, K. W., de WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R. L., O´GARRA, A., 2001: Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 19: 683 - 765

- MORELLI, A., LARRENGINA, A., CHULUYAN, I., KOLKOWSKI, E., FAINBOIM, L., 1996: Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells. Immunology 89: 126 - 134

- MURAKAMI, M., NARAZAKI, M., HIBI, M., YAWAWATA, H., YASUKAWA, K., HAMAGUCHI, M., TAGA, T., KISHIMOTO, T., 1991: Critical cytoplasmatic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. Proc. Natl., Acad., Sci. USA 88: 11349 - 11353

- MURATA, T., TAGUCHI, J., PURI, R. K., 1998: Interleukin-13 receptor alpha´ but not alpha chain: a functional component of interleukin-4 receptors. Blood 91: 3884 - 3891

- MURPHY, F. J., HAYES, M. P., BURD, P. R., 2000: Disperate intracellular processing of human IL12 preprotein subunits: Atypical processing of the p35 signal peptide. J. Immunol. 164: 839 - 847

- NAKANISHI, K., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T., AKIRA, S., 1996: Essential role of STAT6 in IL-4 signaling. Nature 380: 627 - 630

- NAKATA, T., NARAZAKI, M., HIRATA, M., MATSUMOTO, T., MINAMOTO, S., AONO, A., NISHIMOTO, N., KAJITA, T., TAGA, T., YOSHIZAKI, K., AKIRA, S., KISHIMOTO, T., 1997: Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. Nature 387: 924 - 929

- NARUMIYA, S., SUGIMOTO, Y., USHIKUBI, F., 1999: Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiol. Rev. 79: 1193 - 1226

- NELMS, K, KEEGAN, A. D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J. J.; PAUL, W. E.; 1999: The IL-4 Receptor: Signaling Mechanisms and Biological Functions. Annu. Rev. Immunol.17: 701 - 738

- NICOLA, N. A., Structural aspects of cytokine/receptor interactions. Ann N Y Acad Sci, 1995. 766: 253 - 262

- NOBEN-TRAUTH, N., SHULTZ, L. D., BROMBACHER, F., URBAN, J. F. Jr., GU, H., PAUL, W. E., 1997: An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10838 - 10843

- OBIRI N. I., DEBINSKI, W., LEONARD, W. J., PURI, R. K. 1995: Receptor for IL-13. Interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2,4,7,9 and 15. J. Biol. Chem. 270: 8797 - 8804
- OHARA, J., PAUL, W. E., 1988: Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8221 - 8225
- PALMBLAD, J., 1990: Eicosanoids and modulation of inflammatory and immune responses. Scand. J. Clin. Lab., 50: 168 - 171
- PANZER, U., UGUCCIONI, M. 2004: Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. Eur. J. Immunol. 34: 3682 - 3689
- PAUL, W., 1991: Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood 77: 1859 - 1870
- PAZ, K. HEMI, R, LeROITH, D., KARASIK, A., ELHANANY, E., KANETY, H., ZICK, Y., 1997: A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonin phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosin phosphorylation. J. Biol. Chem. 272: 29911 - 29918
- PIEMONTI, L., BERNASCONI, S., LUINI, W., TROBONJACA, Z., MINTY, A., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A., 1995: IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. Eur. Cytokine Netw. 6(4): 245 - 252
- RANE, S. G., REDDY, E. P., 2000: Janus kinases: components of multiple signaling pathways. Oncogene 19 (49): 5662 - 5679
- ROMANI, N., GRUNER, S., BRANG, D., KAMPGEN, E., LENZ, A., TROCKENBACHER, B., KONWALINKA, G., FRITSCH, P. O., STEINMAN, R. M., SCHULER, G., 1994: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J. Exp. Med. 180: 83 - 93
- ROPER, R. L., PHIPPS, R.P., 1994: Prostaglandin E2 regulation of the immune response. Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. 22: 101 - 111
- RYAN, J. J., McREYNOLDS, L. J., KEEGAN, A., WANG, L. H., GARFEIN, E., ROTHMAN, P., NELMS, K., PAUL, W. E., 1996: Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. Immunity 4: 123 - 132
- SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A., 1994: Efficient presentation of solubel antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor-α. J. Exp. Med. 179: 1109 - 1118

- SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A., 1999: Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. J. Exp. Med. 4: 611 - 614
- SALLUSTO, F., SCHAERLI, P., LOETSCHER, P., SCHANIEL, C., LENIG, D., MACKAY, C. R., QIN, S., LANZAVECCHIA, A., 1998: Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. Eur. J. Immunol. 28: 2760 - 2769
- SANTIAGO-SCHWARZ, F., 1999: Positive and negative regulation of myeloid dendritic cell lineage. J. Leuk. Biol. 66: 209 - 216
- SANTIAGO-SCHWARZ, F., BELILOS, E., DIAMOND, B., CARSONS, S. E., 1992: TNF in combination with GMCSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. J. Leuk. Biol. 52: 274 - 281
- SCANDELLA, E., MEN, Y., GILLESSEN, S., FÖRSTER, R., GROETRUPP, M., 2002: Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. Blood 100: 1354 - 1361
- SCANDELLA, E., MEN, Y., LEGLER, D. F., GILLESSEN, S., PRIKLER, L., LUDEWIG, B., GROETTRUP, M., 2004: CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. Blood 103: 1595 - 1601
- SCHARENBERG, A. M., KINET, J. P., 1996: The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? Cell 87: 961 - 964
- SEDER, R. A., PAUL, W. E., DAVIS, M. M., DE, S. T., GROTH, B. F., 1992: The presence of interleukin-4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T-cells from T-cell receptor transgenic mice. J. Exp. Med. 176: 1091 - 1098
- SEIDEL, H. M., MILOCCO, L. H., LAMB, P., DARNELL, J., E., STEIN, R. Jr., ROSEN, J., 1995: Spacing of palindromic half sites as determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3041 - 3045
- SHEN, C.-H., STAVNEZER, J., 1998: Interaction of STAT6 and NF-κB: Direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. Mol. Cell. Biol. 18 (6): 3395 - 3404
- SHIMODA, K., van DEURSEN, J., SANGSTER, M. Y., SARAWAR, S. R., CARSON, R. T., et al., 1996: Lack of IL-4-induced TH2 response and IgE class switching in mice with disrupted STAT6 gene. Nature 380: 630 - 633

- SNIJDEWINT, F. G. M., KALINSKI, P., WIERENGA, E. A., BOS, J. D., KAPSENBERG, M. L., 1993: Prostaglandin E2 differentially modulate cytokine secretion profiles of human TH lymphocytes. J. Immunol. 150: 5321 - 5329

- A) SORURI, A., KIAFARD, Z., DETTMER, C., RIGGERT, J., KÖHL, J., ZWIRNER, J., 2003: IL-4 down-regulates anaphylatoxin receptors in monocytes and dendritic cells and impairs anaphylatoxin-induced migration *in vivo*. J. Immunol. 170: 3306 - 3314

- B) SORURI, A., RIGGERT, J., SCHLOTT, T., KIAFARD, Z., DETTMER, C., ZWIRNER, J., 2003: Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. J Immunol. 171: 2631 - 2636

- C) SORURI, A., KIM, S., KIAFARD, Z., ZWIRNER, J., 2003: Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. Immunol. Lett. 88: 47 - 52

- SORURI, A., ZWIRNER, J., 2005: Dendtiric cells: limited potential in immunotherapy. IJBCB 37: 241 - 245

- SORURI, A,, GRIGAT, G., FORSSMANN, U., RIGGERT, J., ZWIRNER, J., 2007: β-Defensins chemoattract macrophages and mastcells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved, Eur. J. Immunol. 37: 2474 - 2486

- SOZZANI, S., ALLAVENA, P., D`AMICO, G., LUINI, W., BIANCHI, G., KATAURA, M., IMAI, T., YOSHIE, O., BONECCHI, R., MANTOVANI, A., 1998: Differential regulation of chemokine rec eptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. J. Immunol. 161: 1083 - 1089

- SOZZANI, S., LUINI, W., BORSATTI, A., POLENTARUTTI, N., ZHOU., D., PIEMONTI, L., D`AMICO, G., POWER, C. A., WELLS, T. N., GOBBI, M., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A., 1997: Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. J. Immunol. 159: 1993 - 2000

- SOZZANI, S., SALLUSTO, F., LUINI, W., ZHOU, D., PIEMONTI, L., ALLAVENA, P., DAMME, J. V., VALITUTTI, S., LANZAVECCHIA, A., MANTOVANI, 1995: Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a dirstinct set of chemokines. J. Immunol. 155: 3292 - 3295

- STARR, R., WILLSON, T. A., VINEY, E. M., MURRAY, L. J., RAYNER, J. R., JENKINS, B. J., GONDA, T. J., ALEXANDER W. S., METCALF, D., NICOLA, N. A., HILTON, D. J., 1997: A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. Nature 387: 917 - 921

- STEINMAN, R. M., 1991: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu. Rev. Immunol. 9: 271 - 296
- STEINMAN, R. M., INABA, K., 1999: Myeloid dendritic cells. J. Leuk. Biol. 66: 205 - 208
- STOLINA, M., SHARMA, S., LIN, Y., DOHADWALA, M., GARDNER, B., LUO, J., ZHU, L., KRONENBERG, M., MILLER, P. W., PORTANOVA, J., LEE, J. C., DUBINETT, S. M., 2000: Specific inhibition of cylcooxygenase-2 restores antitumor reactivity by alteration the bilance of IL-10 and IL-12 synthesis. J. Immunol. 164: 361 - 370
- STRAUSSMANN, G., KOOTA, V. P., FINKELMAN, F., FONG, M., KAMBAYASHI, T., 1994: Evidence fort the involvement of interleukin-10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by PGE2. J. Exp. Med. 180: 2365 - 2370
- STRYER, L.: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin, Oxford. 4. Auflage, 1995
- SUN, X., J., ROTHENBERG, P., KAHN, C. R., BACKER, J. M., ARAKI, E., WILDEN, P. A., CAHILL, D. A., GOLDSTEIN, B. J., WHITE, M. F., 1991: Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. Nature 352: 73 - 77
- SUN, X. J., CRIMMINS, D. L., MYERS, M. G, MIRALPEIX, M., WHITE, M. F., 1993: Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. Mol. Cell. Biol. 13: 7418 - 7428
- SUN, X. J., WANG, L.M., ZHANG, Y., YENUSH, L., MYERS, M. G. J., GLASHEEN, E., LANE, W. S., PIERCE, J. H., WHITE, M. F., 1995: Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. Nature 377: 173 - 177
- TAKAYAMA, K., GARCIA-CARDENA, G., SUKHOVA, G. K., COMANDER, J., GIMBRONE, M. A., Jr., LIBBY, P., 2002: Prostaglandin E2 supresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. J. Biol. Chem. 277: 44147 - 44154
- TAKEDA, K., KAMANAKA, M., TANAKA, T., KISHIMOTO, T., AKIRA, S., (1999): Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6 deficient mice. J Immunol 157: 3220 - 3223
- TAKEDA, K., KISHIMOTO, T., AKIRA, S., 1997: STAT6: Its role in interleukin 4-mediated biological functions. J. Mol. Med. 75: 317 - 326
- TANIGUCHI, T., 1995: Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. Science 268: 251 - 255

- TE VELDE, A. A., KLOMP, J. P. G., YARD, B. A., DE VRIES, J. E., FIGDOR, C. G., 1988: Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL4. J. Immunol. 140: 1548 - 1554
- THIVIERGE, M., Le GOUILL, C., TREMBLAY, M. J., STANKOVA, J., ROLA-PLESZCZYNSKI, M., 1998 : Prostaglandin E2 induces resistance to human immundeficiency virus-1 infection in monocyte-derived macrophages: downregulation of CCR5 expression by cyclic adenosine monophosphate. Blood 92: 40 - 45
- THORNHILL, M. H., WELLICOMS, S. M., MAHIOUZ, D. L., LANCHBURY, J. S., KYAN-AUNG, U., HASKARD, D. O., 1991: Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFNgamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and –independent binding mechanisms. J. Immunol. 146: 592 - 598
- TILLEY, S., L., COFFMAN, T., M., KOLLER, B. H., 2001: Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxans. J. Clin. Invest. 108: 15 - 23
- URBAN, J. F. Jr., NOBEN-TRAUTH, N., DONALDSON, D. D., MADDEN, K. B., MORRIS, S. C., COLLINS, M., FINKELMAN, F. D., 1998: IL-13, IL-4R alpha, and STAT6 are required fort he expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. Immunity 8: 255 - 264
- VAN der POUW KRAAN, T. C., BOEIJE, L. C., SMEENK, R. J., WIJDENS, J., ARDEN, L. A., 1995: Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. J. Exp. Med. 181: 775 - 779
- VASSILIOU, E., JING, H., GANEA, D., 2003: Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. Cell. Immunol. 223: 120 - 132
- VASSILIOU, E., SHARMA, V., JING, H., SHEIBANIE, F., GANEA, D., 2004: Prostaglandin E2 promotes the survival of bone marrow-derived dendritic cells. J. Immunol. 173: 6955 - 6964
- VELLA, A. T., DOW, S., POTTER, T. A., KAPPLER, J., MARRACK, P., 1998: Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. USA 95: 3810 – 1815
- VIEIRA, P. L., D JONG E. C., WIERENGA, E. A., KAPSENBERG, M. L., KALINSKI, P., 2000: Development of TH1-inducing capacity in myeloid dendritic cells reqires environmental instruction. J. Immunol. 164: 4507 - 4512

- VITETTA, E. S., OHARA, J., MYERS, C. D., LAYTON, J. E., KRAMMER, P. H., PAUL, W. E., 1985: Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. J. Exp. Med. 162: 1726 - 1731

- WANG, L. M., MYERS, M. G. Jr., SUN, X. J., AARONSON, S. A., WHITE, M., PIERCE, J. H., 1993: IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoetic cells. Science 261: 1591 - 1594

- WANG, J., RODERIQUEZ, G., ORAVECZ, T., NORCROSS, M. A., 1998 : Cytokine regulation of human immundeficency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. J. Virol. 72 (9): 7642 - 7647

- WANG, H. Y., ZAMORANO, J., YOERKIE, J. L., PAUL, W. E., KEEGAN, A. D., 1997 : The IL-4 induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate is dependent on Jak-1 expression in human carcinoma cells. J. Immunol. 158 (3): 1037 - 1040

- WARD, P. A., 2004: The dark side of C5a in sepsis. Nature Reviews 4: 133 - 141

- WEINMANN, O., GUTZMER, R., ZWIRNER, J., WITTMANN, M., LANGER, K., LISEWSKI, M., MOMMERT, S., KAPP, A., WERFEL, T., 2003: Up-regulation of C5a receptor expression and function on human monocyte derived dendritic cells by prostaglandin E2. Immunology 110: 458 – 465

- A) WELHAM, M. J., DURIONO, V. LESLIE, K. B., BOWTELL, D., SCHRADER, J. W., 1994: Multiple hemopoietins, with the exception of interleukin-4, induces modification of Shc and mSos1, but not their translocation. J. Biol. Chem. 269: 21165 - 21176

- B) WELHAM, J. M., DURIONO, V., SCHRADER, J. W., 1994: Interleukin-4 dependent proliferation dissociates p44 erk1, erk2, and p21ras activation from cell growth. J. Biol. Chem. 269: 5865 - 5873

- WELHAM, M. J., LEARMONTH, L., BONE, H., SCHRADER, J. W., 1995: Interleukin-13 signal transduction in lymphohemopoietic cells. Similarities and differences in signal transduction with interleukin-4 and insulin. J. Biol. Chem. 270: 12286 - 12296

- A) WERFEL, T., ZWIRNER, J., OPPERMANN, M., SIEBER, A., BEGEMANN, G., DROMMER, W., KAPP, A., GÖTZE, O., 1996: CD88 antibodies specifically bind to C5aR on dermal CD117+ and CD14+ cells and react with a desmosomal antigen in human skin. J Immunol 157: 1729 - 1735

- B) WERFEL, T., OPPERMANN, M., BUTTERFIELD, J. H., BEGEMANN, G., ELSNER, J., GÖTZE, O., ZWIRNER, J. 1996: The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a (desArg). Scand J Immunol 44: 30 - 36

- WERFEL, T., OPPERMANN, M., BEGEMANN, G., GÖTZE, O., ZWIRNER, J., 1997: C5a receptors are detectable on mast cells in normal human skin and in psoriatric plaques but not in wheal and flare reactions or in urticaria pigmentosa by immunohistochemistry. Arch Dermatol Res 289: 83 - 86
- WETSEL, R. A., 1995 Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. Curr Opin Immunol 7: 48 - 53
- WETZKER, R., 2004: Irrungen und Perspektiven der Phosphoinositid 3-Kinase-Forschung. BioSpektrum. 5/04, 10. Jahrgang: 620 - 622
- WILLIAMS, J. A. W., SHACTER, E., 1997: Regualtion of macropage cytokine production by PGE2. J. Biol. Chem. 272: 25693 - 25699
- WITMER-PACK, M. D., OLIVER, W., VALINSKY, J., SCHULER, G., STEINMAN, R. M., 1987: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. J. Exp. Med. 166: 1484 - 1498
- WITTHUHN, B. A., SILVENNOINEN, O., MIURA, O., LAI, K. S., CWIK, C., LIU, E. T., IHLE, J. N., 1994: Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukin 2 und 4 in lymphoid and myeloid cells. Nature 370: 153 - 157
- XU, L. L., WARREN, M. K., ROSE, W. L., GONG, W., WANG, J. M., 1996: Human recombinant monocyze chemotactic protein and other CC chemkines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. J. Leuk. Biol. 60: 365 - 371
- YANG, D., CHEN, Q., STOLL, S., CHEN, X., HOWARD, O. M., OPPENHEIM, J. J., 2000: Differential regulation of responsiveness to fMLP and C5a upon dendritic cell maturation correlation with receptor expression. J. Immunol. 165: 2694 - 2702
- YIN, T., TSANG, M. L., YANG, Y. C., 1994: Jak-1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T-lymphocytes. J. Biol. Chem. 269: 26614 - 26617
- YOUN, B.-S., YU, K.-Y., OH, J., LEE, J., LEE, T.-H., BROXMEYER, H. E., 2002: Role of the CC Chemokine receptor 9/TECK interaction in apoptosis. Apoptosis 7: 271 - 276
- ZAMORANO, J., WANG, H. Y., WANG, L. M., PIERCE, J. H., KEEGAN, A. D., 1996: IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. J. Immunol. 157: 4926 - 4934
- ZEIDLER, R., CSANADY, M., GIRES, O., LANG, S., SCHMITT, B., WOLLENBERG, B., 2000: Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. FASEB J. 14: 661 - 668

- ZHOU, L. J., TEDDER, T. F., 1995: Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunglobulin superfamily. J. Immunol. 154: 3821 - 3835
- ZHOU, L. J., TEDDER, T. F., 1996: CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2588 - 2592
- ZLOTNIK, A., FISCHER, M., ROEHM, N., ZIPORI, D., 1987: Evidence for effects of interleukin 4 (B cell stimulatory factor 1) on macrophages: Enhancement of antigen presenting ability of bone marrow-derived macrophages. J. Immunol. 138: 4275 - 4279
- ZLOTNIK, A., MORALES, J., HEDRICK, J. A., 1999: Recent advances in chemokines and chemokine receptors.Crit Rev Immunol 19: 1 - 47
- ZLOTNIK, A., YOSHIE, O., 2000: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 12 (2): 121 - 127
- ZWIRNER, J., GÖTZE, O., BEGEMANN, G., KAPP, A., KIRCHHOFF, K., WERFEL, T., 1999: Evaluation of C3a receptor expression on human leukocytes by the use of novel monoclonal antibodies. Immunology 97: 166 - 172

7. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben:	Name: Claudia Dettmer-Richardt, geborene Dettmer Geburtsort: Mühlhausen/Thüringen Geburtstag: 13.06.1971 Staatsangehörigkeit: deutsch Familienstand: verheiratet Kinder: Tochter Jana, geboren am 14.01.2007
Schulbildung:	
Sept. 1978 - Juli 1988	POS Thomas Müntzer in Mühlhausen/Thür.
Sept. 1988 - Juli 1990	EOS Erich Weinert in Mühlhausen/Thür., Abitur
Ausbildung:	
Sept. 1990 - Juli 1993	Ausbildung zur Medizinisch-technischen Laborassistentin an der Medizinischen Fachschule Erfurt
Okt. 1996 – Nov. 2001	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen Diplomarbeit: „Charakterisierung der Immunantwort nach induzierter Migration Dendritischer Zellen *in vivo*“ in der Abteilung für zelluläre und molekulare Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Fr. PD Dr. rer. nat. Afsaneh Soruri und Prof. Dr. med. Jörg Zwirner
Berufstätigkeit:	
Nov. 1993 – Okt. 1996	Berufliche Tätigkeit als MTA und Tierarzthelferin
Dez. 2001 – Sept. 2006	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für zelluläre und molekulare Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Fr. PD Dr. rer. nat. Afsaneh Soruri und Prof. Dr. med. Jörg Zwirner
Okt. 2002 – Sept. 2006	praktisches Arbeiten zum Zweck der Dissertation zum Thema: „Untersuchung zur wechselseitigen Beeinflussung von Chemotaxinen und Dendritischen Zellen“

Studienbegleitende Tätigkeiten: Honorardozententätigkeit (Chemie, Labormedizin) bei Arzt- und Tierarzthelferinnen in der Ausbildung an der BBS für Gesundheit und Soziales in Mühlhausen/Thür.

Studentische Hilfskraft in der Abteilung für Zoologie und Anthropologie der Georg-August-Universität Göttingen bei Prof. Willmann

Studentische Hilfskraft in der Abteilung für zelluläre und molekulare Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Fr. Prof. Dr. rer nat. Afsaneh Soruri und Prof. Dr. med. Jörg Zwirner

Praktika: Mikroskopierkurs der Hämatologie, Prof. Dr. med. Kunze, Medizinische Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

Blockpraktikum „Endokrinologie“, Prof. Dr. rer. nat. Hubertus Jarry, Frauenklinik Medizinische Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

Labormedizinische Praktika im Kreiskrankenhaus Unstrut-Hainich-Kreis Zentrallabor in Mühlhausen/Thür.

Sprachkenntnisse: Englisch (fließend)

Russisch (Grundkenntnisse)

Französisch (Grundkenntnisse)

Veröffentlichungen: **Poster**: Interleukin-4 inhibits dendritic cell migration induced by inflammatory chemotaxis *in vivo*, 11th International Congress of Immunology, 22. - 27. Juli 2001, Stockholm, Schweden

Poster: IL-4 exerts broad and potent inhibitory effects on the chemotactic mobilization of dendritic cells and macrophages, 16. European Congress of Immunology, 6. - 9. September 2006, Paris, Frankreich

Paper: IL-4 down-regulates anaphylatoxin receptors in Monocytes and Dendritic Cells and impairs anaphylatoxin-induced migration *in vivo*, Journal of Immunology, 2003 Mar 15; 170 (6): 3306 - 14

Paper: Anaphylatoxin C5a induces Monocyte recruitment and differentiation into Dendritic Cells by TNF-α and Prostaglandin E_2-dependent mechanisms, Journal of Immunology, 2003 Sep 1; 171 (5): 2631 - 6