

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE)  
Institut für Zellbiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dietmar Vestweber

**Die Rolle des interzellulären Adhäsionsmoleküls-2 (ICAM-2)  
bei der endothelialen Adhäsion und Transmigration  
muriner dendritischer Zellen in vitro**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Klaus Wethmar  
aus Telgte

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. D. Vestweber

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. S. Grabbe

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE), Institut für Zellbiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dietmar Vestweber  
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dietmar Vestweber  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. S. Grabbe

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Die Rolle des interzellulären Adhäsionsmoleküls-2 (ICAM-2) bei der endothelialen Adhäsion und Transmigration muriner dendritischer Zellen in vitro

Klaus Wethmar

Die Leukozyten des Blutes müssen aus dem Blutgefäßsystem auswandern, um in den verschiedenen Körpergeweben ihre Abwehrfunktionen ausüben zu können. Dieser Vorgang wird durch das Modell der endothelialen Adhäsions- und Transmigrationskaskade beschrieben, wonach die Leukozyten zunächst an der Gefäßwand entlang rollen (1), dann aktiviert werden (2), fest adhären (3) und schließlich durch die innere Zellschicht der Gefäße (Endothel) hindurchwandern (4). In dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der Extravasation dendritischer Zellen, einer speziellen Leukozytenpopulation, untersucht. Ihre Fähigkeit zur Aufnahme körperfremder Stoffe (Phagozytose) und zur Initiierung spezifischer Immunantworten durch Lymphozyten machen sie zu wichtigen Vermittlern zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Um diesen Zelltyp, der im Blut nur in recht geringer Zahl vorhanden ist, besser untersuchen zu können, wurden aus dem Knochenmark von Mäusen mit Hilfe der Zytokine GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor) und IL-4 (Interleukin-4) unreife und reife dendritische Zellen differenziert. Ihr Adhäsions- und Transmigrationsverhalten wurde anschließend in statischen in vitro-Experimenten mit Hilfe dreier muriner Endothel-Zelllinien untersucht, die sich für ihre Expression der als  $\beta_2$ -Integrin-Liganden bekannten interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 unterschieden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unreife, nicht jedoch reife murine dendritische Zellen zur transendothelialen Migration fähig sind. Dabei ist ein erheblicher Teil der Transmigration unreifer dendritischer Zellen von endothelialelem ICAM-2 abhängig. Außerdem kann auch für die endotheliale Adhäsion ein bedeutender ICAM-2-Beitrag nachgewiesen werden. Demgegenüber wird weder an aufgereinigtem ICAM-1-Fc-Fusionsprotein, noch an den Endothelium-Zellen eine ICAM-1-spezifische Adhäsion beobachtet. Durch Experimente mit  $\beta_2$ -Integrin-blockierenden Antikörpern und  $\beta_2$ -Integrin-defizienten dendritischen Zellen wird gezeigt, dass die beobachteten ICAM-2-vermittelten Interaktionen zwischen den unreifen dendritischen Zellen und dem Endothel unabhängig von den bisher bekannten ICAM-2-Liganden der  $\beta_2$ -Integrin-Familie sind. Die vorliegenden Ergebnisse weisen damit auf die Existenz weiterer,  $\beta_2$ -Integrin-unabhängiger Liganden für endotheliales ICAM-2 auf den dendritischen Zellen hin.

Mit der hier identifizierten Interaktion unreifer dendritischer Zellen mit endothelialelem ICAM-2 konnte eine weitere Facette der molekularen Mechanismen der leukozytären Extravasation verstanden und ein möglicher Ansatzpunkt für immunregulatives therapeutisches Eingreifen gefunden werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2004

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Immunsystem .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Unspezifische und spezifische Immunabwehr .....	4
2.1.2	Zelltypen und Funktionen .....	4
2.1.2.1	Granulozyten .....	5
2.1.2.2	Lymphozyten .....	5
2.1.2.3	Antigen-präsentierende Zellen.....	7
2.1.2.4	Endothelzellen .....	11
<b>2.2</b>	<b>Endotheliale Adhäsion und Transmigration der Leukozyten .....</b>	<b>13</b>
2.2.1	Die leukozytäre Adhäsions- und Transmigrationskaskade .....	13
2.2.1.1	Selektine und Selektinliganden.....	15
2.2.1.2	Chemokine und Chemokinrezeptoren .....	17
2.2.1.3	Integrine und Integrinliganden .....	18
2.2.1.4	Molekulare Grundlagen der Extravasation.....	22
<b>2.3</b>	<b>Spezielle Untersuchungen zur endothelialen Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Spezielle Untersuchungen zu ICAM-2.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Biologisches Material.....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Murines Knochenmark.....	34
3.1.2	Zellen und Kulturmedien.....	34
3.1.3	Antikörper .....	36
<b>3.2</b>	<b>Allgemeine Methoden der Zellkultur.....</b>	<b>37</b>
3.2.1	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen .....	37
3.2.2	Auftauen von eukaryotischen Zellen nach Kryokonservierung .....	38
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl .....	38
3.2.4	Cytospin.....	39
3.2.5	Zellfärbungen.....	39
3.2.5.1	Färbung dendritischer Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff.....	39
3.2.5.2	Färbung der Endothelzellrasen mit Filipin .....	40
<b>3.3</b>	<b>Gewinnung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark ....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Herstellung unreifer dendritischer Zellen .....	42
3.3.2	Herstellung reifer dendritischer Zellen .....	42
<b>3.4</b>	<b>Aufreinigung von ICAM-1-Fc-Fusionsprotein .....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
3.4.2	Coomassie Färbung .....	45
<b>3.5</b>	<b>Immunologische Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.5.1	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....	46
3.5.2	Cell-surface-ELISA .....	47

<b>3.6</b>	<b>Funktionelle Experimente in vitro .....</b>	<b>49</b>
3.6.1	Adhäsionsexperimente mit immobilisierten Fusionsproteinen .....	49
3.6.2	Adhäsionsexperimente mit Endothel .....	50
3.6.3	Transmigrationsexperimente .....	52
<b>3.7</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Phänotypisierung der verwendeten Zellen.....</b>	<b>55</b>
4.1.1	Phänotypisierung der dendritischen Zellen.....	55
4.1.2	Phänotypisierung der immortalisierten Endothel-Zelllinien .....	60
4.1.2.1	FACS-Analyse der Endothel-Zelllinien .....	60
4.1.2.2	Cell-surface-ELISA der Endothel-Zelllinien.....	63
<b>4.2</b>	<b>Adhäsion unreifer dendritischer Zellen.....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an Endothelium-Zellen.....	65
4.2.2	Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an Fusionsproteinen .....	68
4.2.2.1	Gewinnung und Aufreinigung von ICAM-1-Fc-Fusionsprotein.....	68
4.2.2.2	Adhäsion an ICAM-1-Fc-Fusionsprotein.....	69
<b>4.3</b>	<b>Transendotheliale Migration dendritischer Zellen.....</b>	<b>71</b>
4.3.1	Migration der dendritischen Zellen durch Wildtyp-Endothelium .....	71
4.3.2	Charakterisierung der transmigrierenden Zellpopulation .....	72
4.3.3	ICAM-2-abhängige Transmigration unreifer dendritischer Zellen .....	78
4.3.4	ICAM-2-abhängige Transmigration bei Blockade der $\beta_2$ -Integrine durch einen monoklonalen Antikörper .....	80
4.3.4.1	Test der Antikörperbindung an unreife dendritische Zellen .....	80
4.3.4.2	Transmigration unreifer dendritischer Zellen in Gegenwart eines blockierenden CD18-Antikörpers.....	81
4.3.5	Transendotheliale Migration CD18-defizienter, unreifer dendritischer Zellen .....	83
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
<b>5.1</b>	<b>In vitro-Differenzierung muriner dendritische Zellen .....</b>	<b>87</b>
<b>5.2</b>	<b>Transendotheliale Migration unreifer dendritischer Zellen.....</b>	<b>91</b>
<b>5.3</b>	<b>Bedeutung von ICAM-2.....</b>	<b>94</b>
5.3.1	Adhäsionsexperimente .....	94
5.3.2	Transmigrationsexperimente .....	97
<b>6</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>120</b>

## 1 Zusammenfassung

Die Leukozyten des Blutes müssen aus dem Blutgefäßsystem auswandern, um in den verschiedenen Körpergeweben ihre Abwehrfunktionen ausüben zu können. Dieser Vorgang wird durch das Modell der endothelialen Adhäsions- und Transmigrationskaskade beschrieben, wonach die Leukozyten zunächst an der Gefäßwand entlang rollen (1), dann aktiviert werden (2), fest adhärieren (3) und schließlich durch die innere Zellschicht der Gefäße (Endothel) hindurchwandern (4).

In dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der Extravasation dendritischer Zellen, einer speziellen Leukozytenpopulation, untersucht. Ihre Fähigkeit zur Aufnahme körperfremder Stoffe (Phagozytose) und zur Initiierung spezifischer Immunantworten durch Lymphozyten machen sie zu wichtigen Vermittlern zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Um diesen Zelltyp, der im Blut nur in recht geringer Zahl vorhanden ist, besser untersuchen zu können, wurden aus dem Knochenmark von Mäusen mit Hilfe der Zytokine GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor) und IL-4 (Interleukin-4) unreife und reife dendritische Zellen differenziert. Ihr Adhäsions- und Transmigrationsverhalten wurde anschließend in statischen in vitro-Experimenten mit Hilfe dreier muriner Endothel-Zelllinien untersucht, die sich für ihre Expression der als  $\beta_2$ -Integrin-Liganden bekannten interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unreife, nicht jedoch reife murine dendritische Zellen zur transendothelialen Migration fähig sind. Dabei ist ein erheblicher Teil der Transmigration unreifer dendritischer Zellen von endothelalem ICAM-2 abhängig. Außerdem kann auch für die endotheliale Adhäsion ein bedeutender ICAM-2-Beitrag nachgewiesen werden. Demgegenüber wird weder an aufgereinigtem ICAM-1-Fc-Fusionsprotein, noch an den Endothelium-Zellen eine ICAM-1-spezifische Adhäsion beobachtet. Durch Experimente mit  $\beta_2$ -Integrin-blockierenden Antikörpern und  $\beta_2$ -Integrin-defizienten dendritischen Zellen wird gezeigt, dass die beobachteten ICAM-2-vermittelten Interaktionen zwischen den unreifen dendritischen Zellen und dem Endothel unabhängig von

den bisher bekannten ICAM-2-Liganden der  $\beta_2$ -Integrin-Familie sind. Die vorliegenden Ergebnisse weisen damit auf die Existenz weiterer,  $\beta_2$ -Integrin-unabhängiger Liganden für endotheliales ICAM-2 auf den dendritischen Zellen hin.

Mit der hier identifizierten Interaktion unreifer dendritischer Zellen mit endothelialelem ICAM-2 konnte eine weitere Facette der molekularen Mechanismen der leukozytären Extravasation verstanden und ein möglicher Ansatzpunkt für immunregulatives therapeutisches Eingreifen gefunden werden.



## 2 Einleitung

### 2.1 *Immunsystem*

Unter dem Begriff 'Immunsystem' werden alle Organe, alle zellulären und molekularen Bestandteile eines Organismus zusammengefasst, welche die Bekämpfung und Abwehr von Krankheitserregern (Pathogenen) ermöglichen. Beim Menschen und vielen hochentwickelten Tieren unterscheidet man dabei zwei eng miteinander verflochtene Systeme: das der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr einerseits und das der erworbenen, adaptiven oder spezifischen Immunabwehr andererseits. Zentrale Bedeutung innerhalb beider Anteile kommt dabei den Leukozyten zu, die als nicht sesshafte, sogenannte 'weiße Blutkörperchen' über das Gefäßsystem durch den gesamten Organismus patrouillieren, Fremdstoffe, Krankheitserreger (Pathogene) und entartete Zellen erkennen und, je nach Zelltyp, eine spezifische Abwehrreaktion einleiten oder ausführen können. Dabei findet eine ständige Auswanderung der Immunzellen aus der Blutbahn in entzündetes, aber auch in ruhendes Gewebe statt. Diese Durchwanderung der inneren Zellschicht der Gefäßwand (Endothel) wird auch als endotheliale Transmigration bezeichnet und ist für die reibungslose Funktion des Immunsystems von grundlegender Bedeutung. Sie wird über direkte Zell-Zell-Kontakte, die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Adhäsionsmoleküle auf den Zelloberflächen und über lösliche Botenstoffe, die Zytokine und Chemokine, reguliert.

Die endotheliale Transmigration der Leukozyten war in den vergangenen Jahrzehnten immer wieder Gegenstand immunologischer und medizinischer Forschung. Dadurch konnten die Entstehung entzündlicher Erkrankungen sowie eine Reihe von Immunschwächekrankheiten besser verstanden werden und es ergaben sich Möglichkeiten, regulatorisch bzw. therapeutisch in die Funktion des Immunsystems einzugreifen.

In dieser Arbeit wurden die endotheliale Adhäsion und Transmigration eines hochspezifischen leukozytären Zelltyps, der dendritischen Zellen, untersucht. In den folgenden Kapiteln der Einleitung soll die Bedeutung und Funktionsweise

der dendritischen Zellen innerhalb des Immunsystems veranschaulicht werden. Darüber hinaus werden die bis zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Erkenntnisse über die Mechanismen der Transmigration der Leukozyten im Allgemeinen, sowie Untersuchungen zur Differenzierung und Transmigration dendritischer Zellen im Speziellen vorgestellt.

### **2.1.1 Unspezifische und spezifische Immunabwehr**

Das angeborene, unspezifische Immunsystem ist konstitutiver und ubiquitär verfügbarer Bestandteil des menschlichen Organismus. Neben den vielfältigen allgemeinen Schutzeinrichtungen des Körpers, wie z. B. der physikalischen Barrierefunktion der Haut, der Azidität des Mageninhaltes oder der antibiotischen Wirksamkeit des Schweißes, besteht es aus spezialisierten Abwehrzellen und hochkomplexen, feinregulierten molekularen Systemen. Die Proteine und Enzyme des im Blut vorhandenen Komplementsystems sind beispielsweise dazu in der Lage, an bestimmte Arten von Mikroorganismen zu binden und diese nach Ablauf einer Kette von Reaktionen unmittelbar abzutöten. Darüber hinaus aktiviert das Komplementsystem häufig den zellulären Arm der unspezifischen Immunabwehr, bestehend aus Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Diese Zellen wandern frühzeitig aus dem Blut in betroffene Gewebe aus und bekämpfen dort die unterschiedlichsten Pathogene durch Phagozytose (Aufnahme von Fremdmaterial in die Zelle).

Die spezifische oder erworbene Immunabwehr erfolgt dagegen durch eine andere Art von hochspezialisierten Leukozyten: Die sogenannten Lymphozyten erkennen und bekämpfen mit Hilfe von Oberflächenrezeptoren oder durch die Sekretion von Antikörpern jeweils nur eine limitierte Auswahl von Pathogenen oder sogar nur ein einziges, für sie spezifisches Pathogen. Die einzelnen Subtypen der Lymphozyten und ihre Funktion werden in Kap. 2.1.2.2 vorgestellt.

### **2.1.2 Zelltypen und Funktionen**

Alle im Blut vorkommenden Leukozyten gehen auf eine gemeinsame, pluripotente Stammzelle im Knochenmark zurück. Ihre Abkömmlinge differenzieren sich entweder zu lymphoiden Vorläuferzellen, aus denen

letztendlich Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) hervorgehen, oder zu myeloiden Vorläuferzellen, welche Monozyten und Granulozyten hervorbringen. Erythrozyten und Megakaryozyten entwickeln sich ebenfalls aus myeloiden Vorläuferzellen, spielen jedoch für die Immunabwehr nur eine untergeordnete Rolle (Janeway *et al.*, 1999). Im folgenden sollen die einzelnen Zelltypen im Hinblick auf ihre Funktionen innerhalb des Immunsystems kurz vorgestellt werden. Verstärkte Aufmerksamkeit sei dabei den dendritischen Zellen gewidmet, da diese Forschungsgegenstand der vorliegenden Arbeit waren.

### **2.1.2.1 Granulozyten**

Granulozyten erhielten ihren Namen durch die unterschiedlich anfärbbaren Einschlusskörperchen (Granula) im Zytoplasma. Darüber hinaus werden sie auch polymorphkernige Leukozyten genannt, was auf ihren unregelmäßig geformten, oft gelappten Zellkern zurückzuführen ist. Sie sind hauptverantwortlich für die schnelle Bekämpfung v.a. bakterieller Infektionen, da sie als erste in die frisch infizierten Gebiete einwandern. Krankheitserreger werden durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen abgetötet, anschließend phagozytiert und abgebaut. Dabei schütten die Granulozyten proinflammatorische Botenstoffe (Zytokine) aus, die die Entzündungsreaktionen des Endothels verstärken (Kap. 2.1.2.4). Dadurch werden weitere Leukozyten wie Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen aus dem Blut an den Ort der Infektion rekrutiert, so dass sie sich mit ihren spezifischen Funktionen an der Abwehrreaktion beteiligen können.

### **2.1.2.2 Lymphozyten**

Die Entwicklung aller Lymphozyten beginnt ausgehend von einer gemeinsamen Stammzelle im Knochenmark, die vollständige Ausreifung erfolgt aber erst in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus). Danach lassen sich die B(Bursa fabricii)- und T(Thymus)-Lymphozyten unterscheiden. B-Lymphozyten sind Vorgänger der Antikörper-produzierenden Plasmazellen. T-Zellen differenzieren einerseits zu direkt zytotoxischen Effektorzellen, andererseits zu T-Helferzellen (Th-Zellen), die durch spezifische

Zytokinexpression als Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen verschiedene immunregulatorische Funktionen übernehmen. B- und T-Zellen sind zur Ausbildung von Gedächtniszellen (memory-cells) befähigt, die bei erneutem Antigenkontakt eine unverzügliche Immunantwort erlauben. Diese Gedächtniszellen bilden die zelluläre Grundlage für die in der Medizin häufig verwendeten Impfungen und gewährleisten oft eine dauerhafte Immunität des Organismus gegen das jeweilige Antigen.

Nach ihrer Ausreifung in den primären lymphatischen Organen wandern die Lymphozyten über die Blutbahn in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten, Milz und die Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) ein, die sie an spezifischen Adhäsionsmolekülen hier anzutreffender postkapillärer Venolen, den sogenannten 'high endothelial venules' (HEV), erkennen. Diese gezielte Auswanderung in lymphatische Organe wird als Lymphozyten-'homing' bezeichnet. Begegnen sie dort nicht dem für sie spezifischen Antigen, verlassen sie das Organ über die efferenten Lymphgefäße und migrieren in angeschlossene lymphatische Organe oder erreichen schließlich über den Ductus thoracicus erneut den Blutkreislauf. In diesem Rezirkulationskreislauf durchwandern die Lymphozyten auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen solange den Organismus, bis sie ihm begegnen oder irgendwann ohne Antigenkontakt zugrunde gehen.

Trifft z. B. ein T-Lymphozyt während dieser Rezirkulation in einem Lymphknoten auf eine Antigen-präsentierende Zelle der unspezifischen Immunabwehr (Kap. 2.1.2.3), die das geeignete Antigen in Verbindung mit kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche trägt, wird er durch diese aktiviert und zur klonalen Proliferation angeregt. Die so gewonnenen Effektor-T-Zellen verlassen daraufhin das lymphatische Organ und erreichen über den Blutstrom das infizierte Gewebe, in dem sie nun das für sie spezifische Antigen bekämpfen können. Den im folgenden Abschnitt beschriebenen Antigen-präsentierenden Zellen kommt also große Bedeutung bei der Initiierung spezifischer Immunantworten zu.

Eine B-Zelle bringt nach einem solchen Kontakt durch klonale Proliferation Plasmazellen hervor, die alle den gleichen, gegen das auslösende Antigen

gerichteten Antikörper produzieren. Der ins Blut sezernierte Antikörper bindet dann überall im Organismus an das entsprechende Antigen und markiert es selbst oder die jeweilige Trägerzelle für eine Ingestion durch Phagozyten bzw. die Zerstörung durch Komplement.

### **2.1.2.3 Antigen-präsentierende Zellen**

Antigen-präsentierende Zellen (APC) gelten als Vermittler zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Ihre Gruppe umfasst neben B-Lymphozyten vor allem Makrophagen und dendritische Zellen. Die letztgenannten phagozytieren und zersetzen unspezifisch Fremdmaterial und können dann, durch Präsentation der Fremdstoffe auf ihrer Oberfläche, eine Aktivierung des spezifischen Abwehrsystems, genauer gesagt, der im vorigen Abschnitt beschriebenen Lymphozyten, hervorrufen (Sozzani *et al.*, 1999a).

Da sich diese Arbeit mit der Adhäsion dendritischer Zellen am Endothel und ihrer transendothelialen Migration beschäftigt, soll dieser Zelltyp im Folgenden genauer vorgestellt werden.

#### **Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen wurden bereits vor 135 Jahren als Langerhans-Zellen in der Haut entdeckt, gerieten dann jedoch für lange Zeit in Vergessenheit (Langerhans, 1868). Erst nach der „Identifizierung eines neuen Zelltyps in peripheren lymphatischen Organen der Maus“ durch Steinman *et al.* im Jahre 1973 wurden die Erkenntnisse über die Bedeutung und Aufgaben der dendritischen Zellen durch intensive Studien entscheidend verbessert (Steinman & Cohn, 1973). Die im Vergleich zu anderen relativ geringen Zahlen dendritischer Zellen im peripheren Blut sowie ihre große phänotypische Variabilität haben gezielte Studien zur Biologie dieses Zelltyps lange Zeit sehr erschwert. Um dendritische Zellen besser untersuchen zu können, wurden neben der direkten Isolation primärer dendritischer Zellen aus Blut und Gewebe, verschiedene Strategien zur *ex vivo*-Generierung dieses Zelltyps entwickelt:

1. *Differenzierung aus Blut-Monozyten (v.a. im humanen System)*  
Aufgereinigte Blut-Monozyten werden durch Kultivierung mit Zytokinen

(GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ , u.a.) zu dendritischen Zellen differenziert (Romani *et al.*, 1994; Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

2. *Differenzierung aus Knochenmark (v.a. im murinen System)*  
Frisch isolierte Knochenmarkszellen werden durch Kultivierung mit Cytokinen (GM-CSF, IL-4, u.a.) zu dendritischen Zellen differenziert (Inaba *et al.*, 1992; Labeur *et al.*, 1999; Lutz *et al.*, 1999).
3. *Generierung von immortalisierten dendritischen Zelllinien (Takashima & Matsue, 2001).*

Trotz der so zur Verfügung stehenden größeren Zahl von dendritischen Zellen blieben die Fragen nach einer genauen phänotypischen Definition dieses Zelltyps, der Abgrenzbarkeit gegenüber anderen Antigen-präsentierenden Zellen sowie die Frage nach dem genauen Abstammungs- und Differenzierungsweg lange Zeit unbeantwortet. Aus diesem Grund zielten während der vergangenen drei Jahrzehnte zahlreiche Studien darauf ab, Abstammung, Phänotyp und Funktion der dendritischen Zellen genauer zu untersuchen. Dabei wurden in Thymus, Lymphknoten, Milz und Blut von Mensch und Maus verschiedene Subtypen dendritischer Zellen identifiziert, die sich in phänotypischer, migratorischer und funktioneller Hinsicht unterscheiden, über deren Abstammung jedoch keine absolute Gewissheit herrscht (Henri *et al.*, 2001; Steinman & Inaba, 1999). Vielfach wird zwischen lymphoiden und myeloiden dendritischen Zellen unterschieden. Während für die lymphoiden dendritischen Zellen eine mit NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten gemeinsame 'lymphoide' Vorläuferzelle angenommen wird (Ardavin *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1991), sollen phagozytierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen und myeloide dendritische Zellen aus einer gemeinsamen 'myeloiden' Vorläuferzelle hervorgehen (Shortman, 2000). Demgegenüber existieren eine Reihe jüngerer Untersuchungen, die eine gemeinsame Vorläuferzelle für die verschiedenen Untergruppen der dendritischen Zellen identifiziert haben, und damit die Unterscheidung in lymphoide und myeloide Zellen in Frage stellen (del Hoyo *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2000; Traver *et al.*, 2000). Da die exakte ontogenetische Entwicklung der dendritischen Zellen für die in dieser Arbeit

angestellten Untersuchungen von untergeordneter Bedeutung ist, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

Größere Einigkeit herrscht über die zentrale Rolle der dendritischen Zellen bei der Vermittlung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Diese umfasst folgende Punkte (Steinman, 1991):

- a. Dendritische Zellen sind zur Aufnahme und Prozessierung von Antigenen in peripheren Geweben befähigt.
- b. Sie durchlaufen innerhalb ihrer Entwicklung Phasen veränderter Migrationseigenschaften: Vor Antigenkontakt erfolgt die Migration aus der Blutbahn in periphere Gewebe, nach Antigenkontakt migrieren sie über die Lymphgefäße zu T-Zell-Regionen sekundärer lymphatischer Organe.
- c. Sie präsentieren die prozessierten Antigene v.a. in lymphatischen Geweben in Kombination mit Proteinen des 'major-histo-compatibility-complex' (MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle) auf ihrer Oberfläche (Thery & Amigorena, 2001).
- d. Ihre Migrationseigenschaften und die Aktivierungsfähigkeit werden entscheidend beeinflusst durch eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche sowie durch die Anwesenheit spezifischer Chemo- und Zytokine in den verschiedenen Geweben.
- e. Je nach Reifegrad und Differenzierungsstufe erfolgt eine phasenspezifische Sekretion ausgewählter Chemokine und Zytokine.

Zusammengenommen sind dendritische Zellen Teil eines Systems, in dem die aufeinander folgenden Entwicklungsstufen derselben Zelle sequentiell unterschiedliche Aufgaben übernehmen: Zunächst wandern unreife dendritische Zellen aus dem Blut in entzündetes Gewebe ein, internalisieren hier Antigene und verlassen danach als ausgereifte Zellen mit veränderten Migrationseigenschaften das betroffene Gebiet über die drainierenden Lymphgefäße. Die verarbeiteten Pathogene werden dann im nächstliegenden sekundären lymphatischen Organ, z. B. einem Lymphknoten, den Zellen der

spezifischen Immunabwehr in Kombination mit kostimulatorischen Oberflächenmolekülen und unter Ausschüttung aktivierender Zyto- und Chemokine präsentiert. Diese Eigenschaften machen dendritische Zellen zu den effektivsten Aktivatoren naiver, antigenspezifischer T-Zellen (Sozzani *et al.*, 1999a). Gleichzeitig wird aber besonders den lymphoiden dendritischen Zellen eine eher immunregulatorische denn aktivierende Funktion beigemessen: Vor allem in sekundären lymphatischen Organen regulieren bzw. supprimieren sie T-Zell-Reaktionen gegen Selbst-Antigene durch Inaktivierung der entsprechenden Lymphozyten (Banchereau & Steinman, 1998; Hart, 1997).

Zur Identifizierung einer dendritischen Zelle innerhalb einer gemischten Zellpopulation und zur Unterscheidung der verschiedenen Differenzierungsgrade lassen sich folgende Merkmale heranziehen: Ihre auffällige Morphologie mit zahlreichen, unregelmäßig verteilten Zellausläufern (Dendriten), die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation sowie die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die sie von anderen Leukozyten, insbesondere auch von anderen Antigen-präsentierenden Zellen, unterscheidbar macht. Die wichtigsten Kriterien sind einerseits das Fehlen der sogenannten Lineage-Marker wie CD3 für T-Zellen, CD19 für B-Zellen und NK1.1-Antigen für natürliche Killerzellen, andererseits das Vorhandensein von MHC-Klasse-II Molekülen und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche. In frühen Differenzierungsphasen teilen dendritische Zellen einige Eigenschaften mit Monozyten und Makrophagen, wie z. B. die Expression von CD14 oder die des Fc-Rezeptors (Mahnke *et al.*, 1997). Darüber hinaus verändert sich mit der Differenzierung der dendritischen Zellen auch ihr Expressionsmuster für bestimmte Adhäsionsmoleküle, Chemo- und Zytokinrezeptoren (Hart, 1997). Da sowohl die Unterscheidung zwischen reifen und unreifen dendritischen Zellen sowie die sich damit verändernden Migrationseigenschaften bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung sind, wird hierauf in Kap. 4.1.1 näher eingegangen.



Als Schaltstelle zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem rücken dendritische Zellen in jüngster Vergangenheit immer häufiger in den Mittelpunkt immunologischer Forschung. Wachsende medizinische Bedeutung kommt ihnen z.B. im Bereich der Tumorbekämpfung zu, da sie hier als Vermittler tumorspezifischer Immunreaktionen eingesetzt werden können (Schuler & Steinman, 1997). Außerdem spielen sie eine bedeutende Rolle bei der Übertragung und interzellulären Verbreitung von HIV (human immunodeficiency virus) und bieten auch dort Möglichkeiten für neue Therapieansätze (Piguet & Blauvelt, 2002). Das auf humanen dendritischen Zellen exprimierte Adhäsionsmolekül DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin), das neben Adhäsions- und Migrationsfunktionen auch die Bindung zahlreicher Viren vermittelt, lässt eine weitreichende Bedeutung dieses Zelltyps für die Verbreitung und/oder Bekämpfung viraler Infektionen vermuten (Feng *et al.*, 2004). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings über den molekularen Mechanismus der Auswanderung der dendritischen Zellen aus der Blutbahn wenig bekannt. Genauere Kenntnis dieses, für die immunologische Funktion grundlegenden Schrittes der Extravasation könnte jedoch ein gezieltes therapeutisches Eingreifen in durch dendritische Zellen vermittelte Immunreaktionen ermöglichen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die endotheliale Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades auf molekularer Ebene untersucht. Die bis heute zu diesem Thema veröffentlichten Studien werden in Kap. 2.3 zusammengefasst.

#### **2.1.2.4 Endothelzellen**

Alle in den vorangehenden Kapiteln beschriebenen Zellarten müssen während ihres Lebens mindestens einmal die Wand der Blutgefäße passieren, um in periphere Gewebe zu gelangen. Deshalb kommt den Endothelzellen als innere Auskleidung der Gefäße und als natürliche Barriere zwischen Blutraum und Gewebe eine besondere Bedeutung bei der Auswanderung der Leukozyten zu. Über die reine Trennungsfunktion hinaus werden ihnen zahlreiche regulatorische Aufgaben zugeordnet (Cines *et al.*, 1998):

- a. Endothelzellen vermitteln die homöostatische Rekrutierung von Leukozyten in ruhende Gewebe.
- b. Die Ausschüttung von Chemokinen (Kap. 2.2.1.2) und ihre Bindung auf der Endothelzelloberfläche führt zur Aktivierung von Leukozyten und beeinflusst deren Transmigrationsfähigkeit durch die Gefäßwand Abb. 2.1.
- c. Entzündungsreaktionen des Endothels selbst und seiner Umgebung bewirken die Veränderung des endothelialen Adhäsionsmolekülmusters, und verstärken so die leukozytäre Auswanderung in das betroffene Gebiet.
- d. Endothelzellen exprimieren organ- und gewebespezifisch unterschiedliche Adhäsionsmoleküle zur bevorzugten Rekrutierung ausgewählter Leukozytenarten.

Zahlreiche *in vitro* Experimente werden im humanen System mit Nabelschnur-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) durchgeführt (Gimbrone, 1976). Diese nativen Zellen sind jedoch nur für ca. 10 Passagen, maximal bis zu 5 Monate in Kultur zu halten bis sie schließlich absterben (Bouis *et al.*, 2001). Dadurch ergeben sich immer wieder Probleme bei der experimentellen Reproduzierbarkeit, weil die jeweils frisch isolierten Zellen Unterschiede zur vorausgegangenen Präparation aufweisen. Nach der Etablierung immortalisierter Endothelzelllinien stehen heute für die Erforschung der Interaktionen zwischen Endothel und Leukozyt weitere wertvolle Hilfsmittel zur Verfügung, die diese Probleme überwinden. Solche auch als Endotheliome bezeichneten Zelllinien, wurden beispielsweise durch die Fusion von HUVEC mit der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 (Edgell, McDonald & Graham, 1983) oder durch die Transformation nativer Endothelien mittels Onkogenexpression hergestellt (Schwartz *et al.*, 1991). Auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Endothel-Zelllinien gehen auf die Immortalisierung durch virale Transfektion zurück (Kap. 3.1.2).

## **2.2 Endotheliale Adhäsion und Transmigration der Leukozyten**

### **2.2.1 Die leukozytäre Adhäsions- und Transmigrationskaskade**

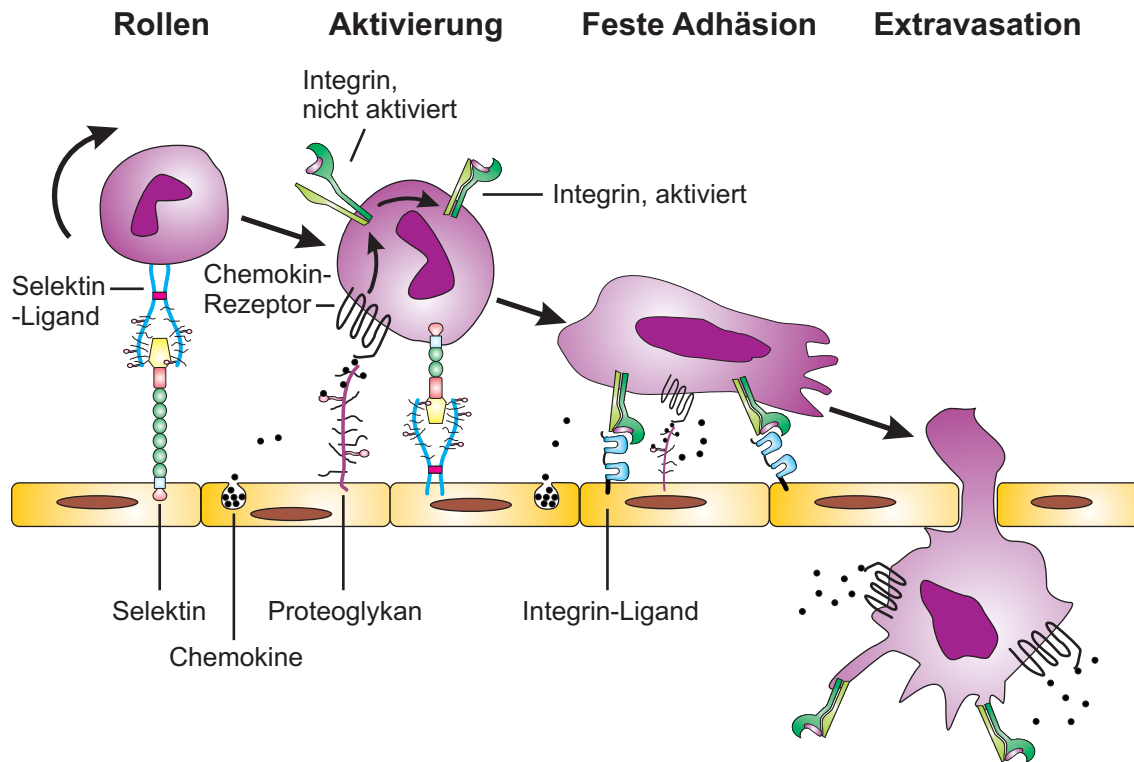
Für die Bekämpfung von in den Körper gelangten Mikroorganismen oder anderer Pathogene ist es von entscheidender Bedeutung, dass Leukozyten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems in der Lage sind, aus dem Blutgefäßsystem in die infizierten Gewebe auszuwandern. Diese Auswanderung geschieht vor allem aus postkapillären Venolen mit Durchmessern von 10-100  $\mu\text{m}$ , in denen die Gefäßwand aus einer einfachen Endothelzellschicht mit darunter liegender Basalmembran besteht und Blutflussgeschwindigkeiten von 1-10 mm/s vorherrschen (Ley, 1999). Um unter diesen Bedingungen die Gefäße verlassen zu können, gehen die frei flotierenden Leukozyten mehr oder weniger transiente molekulare Interaktionen mit den Endothelzellen der Gefäßwand ein, die vielfach in dem Modell der Multi-Step-Adhäsionskaskade zusammengefasst worden sind (Butcher, 1991). Der gesamte Prozeß der Extravasation der Leukozyten ist in Abb. 2.1 zusammengefasst. Er kann in vier einander überlappende Abschnitte unterteilt werden (Springer, 1995):

#### **1. Rollen**

Der ersten molekularen Bindung (Tethering) zwischen Leukozyt und Endothel folgen weitere, recht kurzlebige Bindungen, die vor allem von Selektinen und ihren Liganden (Kap. 2.2.1.1) vermittelt werden. Der Leukozyt ist deutlich gegenüber dem Blutstrom verlangsamt und rollt, von diesem angetrieben, an der Gefäßwand entlang.

#### **2. Aktivierung**

Durch das Rollen kommen die Leukozyten in so engen räumlichen Kontakt mit dem Endothel, dass nun die von diesem exprimierten Chemokine (vgl. Kap. 2.2.1.2) an ihre leukozytären Rezeptoren binden können. Über Signaltransduktionsproteine bewirkt dies eine Aktivierung der Leukozyten und verstärkt die Bindungsfähigkeit zahlreicher Integrine (Kap. 2.2.1.3).



**Abb. 2.1 Die Adhäsions- und Transmigrationskaskade der Leukozyten.**  
Abbildung nach Luster & MacLean, 2000.

### 3. Feste Adhäsion

Um an einer bestimmten Stelle aus dem Gefäß auswandern zu können, muss der Leukozyt zum Stillstand kommen und dabei den Scherkräften des vorbeiströmenden Blutes widerstehen. Hierzu sind stabile Bindungen notwendig, die einerseits ein erneutes Rollen des Leukozyten verhindern müssen, andererseits aber nicht so stark und dauerhaft sein dürfen, dass sie eine Extravasation durch irreversible Immobilisierung verhindern. Diese feste und gleichzeitig flexible Adhäsion wird vor allem durch die in Schritt zwei aktivierten Integrine und ihre Liganden vermittelt.

### 4. Extravasation

Die Extravasation, also die tatsächliche Durchwanderung der Leukozyten durch das Endothel, wurde bislang am wenigsten untersucht, ist derzeit aber Gegenstand intensiver Forschungen. Es existieren zwei Hypothesen über den Weg dieser Migration. Vielfach beschrieben und von zahlreichen Wissenschaftlern anerkannt ist die Beobachtung, dass die Leukozyten die

Endothelzellschicht an Kontaktstellen zwischen den Zellen durchwandern (Burns *et al.*, 1997). Die hierbei beteiligten Moleküle werden in Kap. 2.2.1.4 beschrieben. Alternativ dazu wurde *in vivo* mittels Rekonstruktion sequentieller Elektronenmikroskopaufnahmen der Weg der Transzytose beobachtet, bei dem der Leukozyt durch einen von der Endothelzelle ausgebildeten Membrankanal hindurchwandert (Feng *et al.*, 1998).

Im Folgenden sollen die an der Adhäsions- und Transmigrationskaskade beteiligten Moleküle und ihre funktionelle Bedeutung genauer vorgestellt werden:

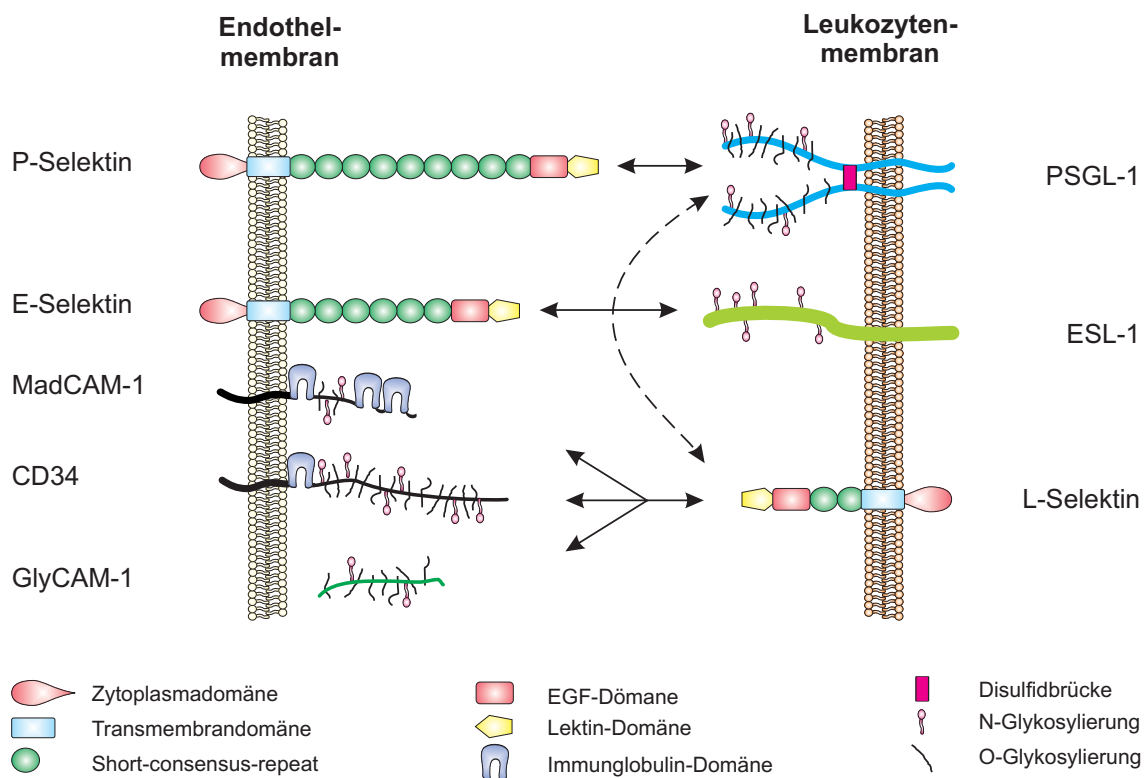
### **2.2.1.1 Selektine und Selektinliganden**

Die Molekülfamilie der Selektine erhielt ihren Namen aufgrund ihrer N-terminalen, extrazellulären Lektin-Domäne, über die sie in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Weise an bestimmte Zuckerstrukturen ihrer Liganden binden können. Man unterscheidet die in Abb. 2.2 dargestellten drei Vertreter L-Selektin (CD62L), für Leukozyten-Selektin, P-Selektin (CD62P), für Plättchen(Thrombozyten)-Selektin und E-Selektin (CD62E), für endotheliales-Selektin (Bevilacqua & Nelson, 1993).

Die drei Selektine ähneln sich in ihrem molekularen Aufbau. Sie bestehen neben der bereits erwähnten N-terminalen Lektin-Domäne aus einer singulären EGF-Domäne mit hoher Homologie zum epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal-Growth-Factor, EGF), die zur optimalen Bindungsfähigkeit der Selektine an ihre Liganden beiträgt (Gibson *et al.*, 1995). Darauf folgen für L-Selektin zwei, für P-Selektin neun und für E-Selektin sechs 'Short-Consensus-Repeat-Domänen' (SCR-Domänen), die für die unterschiedliche Größe der Selektine und die unterschiedliche Entfernung der Lektin-Domäne von der Plasmamembran verantwortlich sind. Es schließt sich jeweils eine Transmembran-Region, gefolgt von einer zytoplasmatischen Domäne an, die eine signaltransduktorische Funktion ausüben kann (Crockett-Torabi, 1998; Steeber *et al.*, 1997).

Während L-Selektin auf der Oberfläche der meisten Blut-Leukozyten zu finden ist (Kansas, 1996), werden P- und E-Selektin nicht konstitutiv auf Plättchen bzw. Endothelzellen exprimiert. P-Selektin wird in speziellen Vesikeln der

Thrombozyten ( $\alpha$ -Granula) und der Endothelzellen (Weibel-Pallade-Körper) gespeichert, welche nach einem auslösenden Reiz mit der Plasmamembran verschmelzen und so P-Selektin an die Oberfläche befördern (Geng *et al.*, 1990; McEver *et al.*, 1989). Die nur auf Endothelzellen zu beobachtende Expression von E-Selektin wird dagegen auf der Transkriptionsebene durch entzündungsfördernde Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 induziert (Bevilacqua *et al.*, 1987).



**Abb. 2.2 Die Selektine und ausgewählte wichtige Liganden.**

P-, E-, L-Selektin = Plättchen-, Endothel-, Leukozyten-Selektin; CD34 = cluster of differentiation 34; MadCAM-1 = Mucosal-addressin cell adhesion molecule-1; GlyCAM-1 = Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1; PSGL-1 = P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1; ESL-1 = E-Selektin-Ligand-1. Abbildung nach Vestweber & Blanks, 1999.

Die Liganden der Selektine sind meist Glykoproteine, die sialylierte und fucosylierte Oligosaccharide wie sialyl-Lewis<sup>x</sup> in N- bzw. O-glykosidischer Bindung tragen (Phillips *et al.*, 1990). Durch posttranskriptionale enzymatische Modifikationen binden sie mit hoher Affinität an die Selektine (Li *et al.*, 1996). In Abb. 2.2 sind einige Selektinliganden aufgeführt, die von unterschiedlicher physiologischer Bedeutung sind. Am besten untersucht ist derzeit die Rolle von

P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), für den in vitro und in vivo eine entscheidende Rolle bei der Interaktion verschiedener Leukozytenarten mit P-Selektin gezeigt werden konnte (Norman *et al.*, 1995; Snapp *et al.*, 1997). Dendritische Zellen dagegen wanderten zwar in E- und P-selektin-abhängiger Weise aus den Blutgefäßen aus (vgl. Kap. 2.3), die Blockade des PSGL-1 durch einen monoklonalen Antikörper zeigte jedoch keinen inhibierenden Effekt auf diese Migration (Pendl *et al.*, 2002).

Den Selektinen insgesamt kommt in erster Linie eine bedeutende Funktion bei der Herstellung des initialen Kontakts zwischen Leukozyt und Gefäßwand zu. Sie vermitteln durch kurzlebige aber starke Bindungen zunächst das Einfangen (Tethering) der Leukozyten aus dem Blutstrom und halten im Folgenden durch ständiges Lösen und Neubilden von Bindungen das Rollen und damit den ununterbrochenen Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel aufrecht (Vestweber & Blanks, 1999). Kontinuierliches Rollen ist in vivo eine unabdingbare Voraussetzung für die Aktivierbarkeit der Leukozyten durch endotheliale Chemokine und damit aller weiteren Schritte der Extravasation (Springer, 1995).

Lange galten die Selektine und, mit Abstrichen, die  $\alpha_4$ -Integrine als einzige Molekülgruppen, die zur Vermittlung leukozytären Rollens am Endothel in der Lage waren (Berlin *et al.*, 1995). Im Jahr 2000 konnte darüber hinaus von Geijtenbeek *et al.* für das Oberflächenlektin DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM grabbing non-integrin) gezeigt werden, dass es neben Adhäsion und Transmigration auch das Rollen humaner dendritischer Zellen am Endothel ermöglicht (Geijtenbeek *et al.*, 2000).

### **2.2.1.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren**

Chemokine sind molekulare Botenstoffe, die sowohl als chemotaktische Faktoren für die Migration von Leukozyten verantwortlich sind, als auch als Signalmoleküle die schnelle Aktivierung der am Endothel entlang rollenden Leukozyten bewirken (Luster, 2000). Die große Diversität der Chemokine (45 verschiedene Chemokine sind derzeit beschrieben) und die ebenso große Diversität der Chemokinrezeptoren (19 derzeit beschrieben), zusammen mit ihrer zell- oder organspezifischen Expression, ergibt ein fein regulierbares

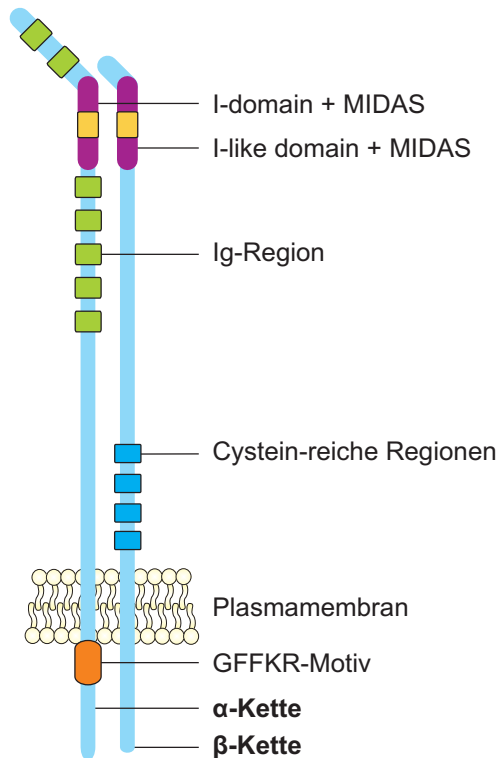
System für die Rekrutierung von Leukozyten in entzündete wie in ruhende Gewebe. An dieser Stelle sollen nur einige wichtige Eigenschaften der Chemokine hervorgehoben werden: Chemokine bilden eine Gruppe relativ kleiner (6-14 kD), meist sezernierter, basischer Proteine, und werden unter anderem von Endothelzellen gebildet (Olson & Ley, 2002). Damit die sezernierten Moleküle nicht vom Blutstrom davongetragen werden, sind sie an Proteoglykane der Endothelzelloberfläche gebunden (Abb. 2.1) und können so ihre aktivierende Wirkung auf die rollenden Leukozyten ortsspezifisch ausüben (Tanaka, Adams & Shaw, 1993). Die Aktivierung erfolgt dabei durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die schnelle, Integrin-aktivierende Signalkaskaden in den Leukozyten auslösen (Murphy, 1994). Aktivierte Integrine bilden dann mit ihren endothelialen Liganden feste und dauerhafte Adhäsionskontakte aus, ohne die eine Transmigration unmöglich wäre.

### **2.2.1.3 Integrine und Integrinliganden**

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die sich aus jeweils einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette zusammensetzen. Bis heute sind acht verschiedene  $\beta$ -Ketten und 16 verschiedene  $\alpha$ -Ketten bekannt, die in insgesamt 22 verschiedenen Kombinationen vorliegen und für zahlreiche zelluläre Funktionen zuständig sind (Helmer, 1999). Diese umfassen Aufgaben bei der Embryonalentwicklung, der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur und der Migration der Leukozyten (Hynes, 1992). Für das in dieser Arbeit untersuchte Adhäsions- und Transmigrationsverhalten von dendritischen Zellen spielen vor allem die ausschließlich auf Leukozyten und Mikrogliazellen exprimierten  $\beta_2$ -Integrine eine Rolle. Auch die auf Leukozyten vorkommenden  $\alpha_4$ -Integrine sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Daher soll sich der folgende Abschnitt ausschließlich mit diesen beiden Unterfamilien der Integrine und ihren jeweiligen Liganden beschäftigen:



Alle  $\beta_2$ -Integrine bestehen aus einer einheitlichen  $\beta$ -Kette (CD18) und einer jeweils spezifischen  $\alpha$ -Kette (CD11). Man unterscheidet die vier Vertreter  $\alpha_L\beta_2$  (Lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1, CD11a/CD18),  $\alpha_M\beta_2$  (Macrophage-differentiation-antigen-1, Mac-1, CD11b/CD18),  $\alpha_X\beta_2$  (p150,95, CD11c/CD18) und  $\alpha_D\beta_2$  (CD11d/CD18), die alle dem in Abb. 2.3 gezeigten Aufbau entsprechen.

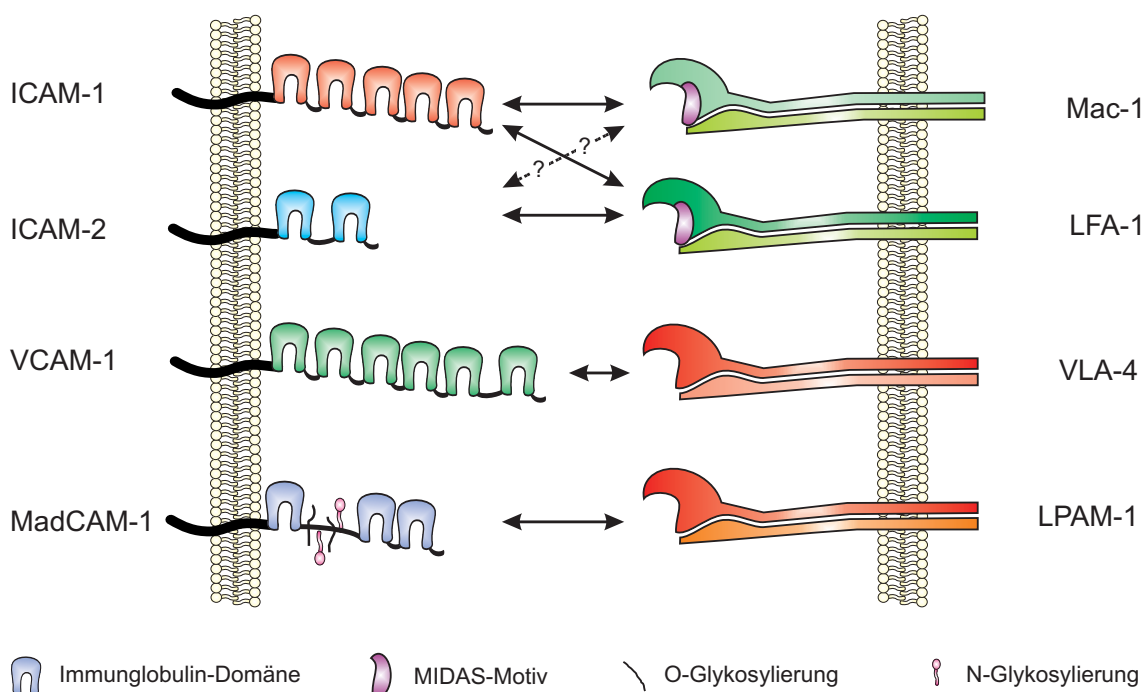


**Abb. 2.3 Aufbau der  $\beta_2$ -Integrine.**  
Abbildung nach Harris, 2000  
& Helmer, 1999.

Der extrazelluläre Teil der verschiedenen  $\alpha$ -Ketten besteht aus sieben, sich wiederholenden Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-repeats). Über die membran-nahen drei 'Ig-repeats' wird der Kontakt mit der  $\beta$ -Kette gebildet, die in der Nähe des N-Terminus eine für die Ligandenbindung wichtige I-ähnliche-Domäne (I-like-domain) trägt (Huang & Springer, 1997b). Die Bezeichnung dieser Domäne entstand aufgrund der Beobachtung, dass sie große Ähnlichkeit zu der in der dritten N-terminalen Domäne der  $\alpha$ -Kette liegenden, ca. 200 Aminosäuren umfassenden 'I-domain' (inserted domain) aufweist, welche in der Lage ist, Ligandenbindung zu vermitteln. Durch

die Aufklärung der Kristallstrukturen der I-Domänen der  $\alpha_L$ - und  $\alpha_M$ -Kette wurde eine Metallionen-abhängige Adhäsionsregion (MIDAS = metal ion-dependent adhesion site) gefunden, in der divalente Metallionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) koordiniert sind, über welche die Ligandenbindung erfolgt (Lee *et al.*, 1995). Diese Bindungsdomäne liegt jedoch erst frei, nachdem die Leukozyten durch Chemokine aktiviert wurden und die Integrine durch 'inside-out-Signale' in eine aktivierte, hochaffine Konformation gebracht wurden. Dies geschieht vermutlich über ein hochkonserviertes Glycin-Phenylalanin-Phenylalanin-Lysin-Arginin-

Motiv (GFFKR-motif), das sich in membrannahen zytoplasmatischen Regionen der  $\alpha$ -Ketten befindet und die Integrine im nicht-aktivierten Zustand in der schwach-affinen Konformation hält (Huang & Springer, 1997a). Besonders offenkundig zeigt sich die Bedeutung der  $\beta_2$ -Integrine bei Individuen, die aufgrund eines genetischen Defekts keine  $\beta_2$ -Integrine produzieren können. Beim Menschen ist mit dem Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndrom-I (LAD I) ein eigenes Krankheitsbild bekannt, welches bei teilweisem oder komplettem Fehlen der Expression der  $\beta_2$ -Kette auftritt. Die Patienten leiden überwiegend an schweren Defekten der Leukozytenmigration, die zu wiederholten heftigen Infektionen oder spontanen Hautulzerationen führen (Anderson & Springer, 1987). Auch  $\beta_2$ -Integrin-defiziente Mäuse weisen sehr ähnliche klinische Symptome auf (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1998b).



**Abb. 2.4 Ausgewählte Integrine und Liganden.**

Abkürzungen: ICAM-1, -2 = Intercellular adhesion molecule-1,-2 (ICAM-3 ist in der Maus nicht exprimiert); VCAM-1 = Vascular cell adhesion molecule-1; MadCAM-1 = Mucosal-addressin cell adhesion molecule-1; Mac-1 = Macrophage-differentiation-antigen-1; LPAM-1 = Lymphocyte Peyer's-patch adhesion molecule-1. Für die Interaktion von ICAM-2 mit Mac-1 ist die physiologische Bedeutung unklar. Abbildung nach Andrian & Mackay, 2000.

Aus der Familie der  $\alpha_4$ -Integrine sollen hier lediglich zwei Vertreter hervorgehoben werden: Very-late-antigen-4 (VLA-4,  $\alpha_4\beta_1$ , CD49d/CD29) und Lymphocyte-Peyer's-patch-adhesion-molecule-1 (LPAM-1,  $\alpha_4\beta_7$ ) sind wie die  $\beta_2$ -Integrine vor allem auf Leukozyten zu finden und vermitteln die Migration von Leukozyten in entzündete Gebiete bzw. das 'homing' bestimmter Lymphozyten zu den 'Peyer's patches' der Darmmucosa (Lobb & Hemler, 1994). Strukturelle Unterschiede zu  $\beta_2$ -Integrinen bestehen darin, dass I-like-domain und MIDAS-like-motif zwar sowohl auf der  $\beta_1$ - als auch auf der  $\beta_7$ -Kette vorhanden sind, die I-domain auf der  $\alpha_4$ -Kette jedoch fehlt (Teixido *et al.*, 1992). Dies erklärt möglicherweise die unterschiedliche Ligandenbindung der  $\beta_2$ - und der  $\alpha_4$ -Integrine (Abb. 2.4).

Die wichtigsten Liganden der hier beschriebenen leukozytären  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Integrine gehören alle der Immunglobulin-Superfamilie an. Sie setzen sich aber aus einer unterschiedlichen Zahl von Immunglobulin-ähnlichen Domänen zusammen und sind verschieden stark glykosyliert (Dustin & Springer, 1999). Einige bedeutende Interaktionspartner der Integrinliganden sind in Abb. 2.4 dargestellt. Man unterscheidet die in ihrem Bindungsverhalten ähnliche Gruppe der 'inter-cellular-adhesion-molecules' (ICAM-1, -2 und -3) von 'vascular-cell-adhesion-molecule-1' (VCAM-1) und 'mucosal-addressin-cell-adhesion-molecule-1' (MAdCAM-1). ICAM-3 wird von Mäusen allerdings nicht exprimiert (Hayflick, Kilgannon & Gallatin, 1998). Durch Aufklärung der Kristallstruktur sowie durch intensive Mutationsversuche der Bindungsregionen der Integrinliganden konnte zwar für alle hier aufgeführten Liganden ein konserviertes Integrin-Bindungs-Motiv beobachtet werden, der strukturelle Aufbau der Region unterscheidet ICAM-1 und ICAM-2 aber deutlich von VCAM-1 und MAdCAM-1 (Casasnovas *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998). Die ICAM tragen eine für die Integrin-Bindung essentielle Aminosäure (Glu-34 für ICAM-1 bzw. Glu-37 für ICAM-2) in der ersten, d.h. N-terminalen Ig-Domäne. Hier ist auch das divalente Kation der Integrin-Bindungsstelle koordiniert, welches von einer flachen Integrinerkennungszone umgeben wird. ICAM-1 und ICAM-2, die sich untereinander durch die verschiedene Zahl extrazellulärer Ig-Domänen unterscheiden, binden bevorzugt an die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 und

Mac-1 (Staunton, Dustin & Springer, 1989). Auf funktionelle Besonderheiten des in dieser Arbeit untersuchten ICAM-2 wird in Kap. 2.4 näher eingegangen. Die beiden Liganden der  $\alpha_4$ -Integrine, VCAM-1 und MAdCAM-1 tragen ebenfalls eine konservierte saure Aminosäure (Asp-37) zur Metallionenkoordination, welche aber im Gegensatz zur muldenförmigen Umgebung bei den  $\beta_2$ -Integrinen an der Spitze einer hervorstehenden Molekülschleife positioniert ist (Casasnovas, Pieroni & Springer, 1999). Möglicherweise erlaubt gerade diese besondere Lage der Bindungsstelle eine Interaktion mit den  $\alpha_4$ -Integrinen VLA-4 und LPAM-1, die keine I-domain und kein MIDAS-motif auf ihrer  $\alpha$ -Kette tragen (Erickson *et al.*, 1998). Die funktionelle Besonderheit der  $\alpha_4$ -Integrine VLA-4 und LPAM-1 besteht in ihrer Fähigkeit, im Gegensatz zu den  $\beta_2$ -Integrinen auch das 'Tethering' und stabile Rollen der Leukozyten am Endothel vermitteln zu können (Alon *et al.*, 1995; Berlin *et al.*, 1995). Die lebenswichtige Funktion der  $\alpha_4$ -Integrine zeigt sich darin, dass Mäuse, die für die  $\alpha_4$ -Kette defizient sind, nicht lebensfähig sind und bereits während der Embryonalentwicklung sterben (Yang, Rayburn & Hynes, 1995).

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften der Integrine wird verständlich, dass die Stärke der Integrinbindung abhängig von der Temperatur und der Gegenwart divalenter Metallionen ist (Kotovuori *et al.*, 1999). Darüber hinaus gelang es durch den Einsatz Integrin-blockierender Antikörper *in vivo* und *in vitro* zu zeigen, dass  $\alpha_4$ - und  $\beta_2$ -Integrine essentielle Funktionen für das Adhäsions- und Migrationsverhalten der Leukozyten inne haben. Einige davon werden in Kap. 2.3 und 2.4 näher beschrieben.

#### **2.2.1.4 Molekulare Grundlagen der Extravasation**

Wie oben erwähnt, sind die molekularen Vorgänge des letzten Schrittes der leukozytären Adhäsions- und Transmigrationskaskade, der Durchwanderung der Endothelzellschicht, bisher nur unzureichend aufgeklärt. In den vergangenen Jahren konnten jedoch einige Moleküle identifiziert werden, die an den interzellulären Kontaktstellen der normalerweise dicht geschlossenen Endothelzellschicht exprimiert werden und direkt oder indirekt an der

leukozytären Diapedese beteiligt sind. Bei diesen besonders in 'Tight-junctions' und 'Adherens-junctions' des endothelialen Zellrasens vorkommenden Molekülen handelt es sich im einzelnen um vier Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (PECAM-1, JAM-A, JAM-B und JAM-C) sowie um das 'vascular-endothelial-cell-specific cadherin' (VE-Cadherin) und CD99, das keiner bekannten Proteinfamilie zuzuordnen ist (Muller, 2003).

PECAM-1 und CD 99, sowie mit Einschränkungen auch JAM-A und JAM-C werden sowohl von Endothelzellen als auch von Leukozyten exprimiert. Für die beiden erstgenannten Moleküle konnte ein sequentieller Beitrag zur leukozytären Transmigration belegt werden, der auf homophiler Interaktion dieser gleichartigen Moleküle von Endothel und Leukozyt beruhte (Muller *et al.*, 1993; Schenkel *et al.*, 2002; Bixel *et al.*, 2004). Dabei schließt sich die CD99 vermittelte Transmigrationsphase zeitlich und räumlich an die vorausgehende PECAM-1-vermittelte Phase an (Schenkel *et al.*, 2002). Endgültige Klarheit über die Rolle von PECAM-1 herrscht jedoch nicht, denn, während es in den oben genannten Experimenten für die leukozytäre Transmigration essentiell zu sein schien, spielte es bei in vitro-Transmigrationsexperimenten unter Einfluss von Scherkräften keine Rolle (Shaw *et al.*, 2001). PECAM-1-defiziente Mäuse weisen darüber hinaus keine phänotypischen Besonderheiten auf (Duncan *et al.*, 1999).

JAM-A, -B und -C sind zum einen über homophile Interaktionen an der leukozytären Transmigration beteiligt, zu anderen wurden für diese Gruppe aber auch heterophile Interaktionen mit den  $\beta_2$ -Integrinen LFA-1 und Mac-1 sowie mit dem  $\alpha_4$ -Integrin VLA-4 beobachtet (Cunningham *et al.*, 2002).

VE-Cadherin, das vor allem im Bereich der 'Adherens-junctions' der Endothelzellen exprimiert wird, hat vermutlich eher indirekten Einfluss. In Regionen der leukozytären Transmigration wird die Expressionsdichte von VE-Cadherin vorübergehend herunterreguliert. Außerdem wird die Transmigration von Neutrophilen bei Blockade des Moleküls mit spezifischen Antikörpern in vivo begünstigt (Gotsch *et al.*, 1997).

### **2.3 Spezielle Untersuchungen zur endothelialen Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen**

Die konstitutive Migration von dendritischen Zellen und deren Vorläuferzellen in periphere Gewebe auch ohne spezifische Entzündungsreize konnte durch zahlreiche Studien belegt werden und ist eine allgemein anerkannte Tatsache (Hart, 1997; Steinman, 1991). Im Gegensatz dazu wurden die molekularen Vorgänge bei der Extravasation der einzelnen dendritischen Zelle durch die Gefäßwand bis heute nur in wenigen Studien untersucht. Bei der Beurteilung der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse muss bedacht werden, dass die verschiedenen Arbeitsgruppen jeweils eigene, nicht einheitliche Methoden zur Differenzierung und zur Definition der dendritischen Zellen anwenden: So werden einerseits humane Blutzellen, die den myeloiden Vorläuferzellmarker CD34 und das als Monozytenmarker bekannte Molekül CD14 exprimieren als dendritische Zellen bezeichnet (Ferrero *et al.*, 1998), während in einer anderen Arbeit gerade diese Zellen durch Depletion aus der dendritischen Zellpopulation entfernt wurden (de la Rosa *et al.*, 2003). In letztgenannter Studie konnte darüber hinaus kein DC-SIGN detektiert werden, obwohl in einer anderen Untersuchung gerade dieses Molekül als Aufnahmekriterium in die Population der dendritischen Zellen galt (Geijtenbeek *et al.*, 2000a).

Die meisten funktionellen Studien zu Adhäsion und Transmigration wurden bislang im humanen System mit aus Blutmonozyten differenzierten dendritischen Zellen durchgeführt. Dabei fand sich eine deutliche Abhängigkeit der Transmigrationsfähigkeit der Zellen von ihrer Differenzierungsstufe. Das unterschiedliche Migrationsverhalten der unreifen und reifen dendritischen Zellen ist vermutlich zum einen auf eine veränderte Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle, zum anderen auf ein sehr unterschiedliches Repertoire von Chemokinrezeptoren in verschiedenen Reifestadien zu erklären. Humane, aus Blutmonozyten differenzierte, unreife dendritische Zellen migrierten *in vitro* verstärkt durch einen Endothelzellmonolayer, wenn Chemokine wie `macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ` (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-3 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) und `monocyte

chemoattractant protein-3' (MCP-3) eingesetzt wurden. Nach Ausreifung der Zellen nahm die chemotaktische Wirkung dieser Stoffe ab, während andere, zuvor wirkungslose Chemokine wie MIP3- $\beta$  und 'stromal-cell derived factor-1' (SDF-1) verstärkte Chemotaxis hervorrufen konnten (Sozzani, Mantovani & Allavena, 1999c). In einer anderen Studie bewirkte die ex vivo-Differenzierung dendritischer Zellen aus Blutmonozyten unter Zugabe von Interleukin-10 (IL-10) eine verminderte Ausreifungsfähigkeit der Zellen, verbunden mit dem Erhalt eines 'unreifen Chemokinrezeptormusters' und eingeschränkter Migrationsfähigkeit zu den drainierenden Lymphknoten nach subkutaner Injektion im Vergleich zu Zellen, die ohne IL-10-Zusatz gewonnen wurden (Takayama *et al.*, 2001).

Im Rahmen weiterer funktioneller Studien konnte belegt werden, dass im humanen System die Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen sowohl durch die weit verbreiteten Interaktionen von ICAM-1 und ICAM-2 mit den  $\beta_2$ -Integrinen vermittelt werden, aber auch  $\beta_1$ -Integrine und der neuartige ICAM-2-Ligande DC-DIGN einen Beitrag leisten. So ließ sich beispielsweise die Adhäsion dendritischer Zellen an HUVEC durch gleichzeitige Blockade der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine (VLA-4 und VLA-5 bzw. LFA-1 und Mac-1) um 70% inhibieren (Bianchi *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1997). In ähnlichen Experimenten wurde eine 10%-ige Transmigration dendritischer Zellen durch unstimuliertes Endothel beobachtet, die sich durch das Anlegen eines Chemokingradienten mit MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  oder RANTES auf ein Vielfaches steigern ließ. Auch hier wurde eine teilweise Abhängigkeit von ca. 50% von den  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrinen gefunden (de la Rosa *et al.*, 2003). Bei einem Vergleich von unreifen und reifen dendritischen Zellen zeigte sich, dass unreife dendritische Zellen ca. dreifach besser an HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) banden als ausgereifte Zellen, während die Adhäsion an HUVEC unabhängig vom Differenzierungsgrad zu sein schien (Nguyen *et al.*, 2002). Auch hier konnte die Adhäsion partiell durch monoklonale Antikörper gegen LFA-1 und Mac-1 blockiert werden. In Ergänzung hierzu identifizierte die Arbeitsgruppe um Yvette van Kooyk im Jahr 2000 neuartige Funktionen für das bereits 1992 entdeckte C-Typ-Lektin DC-SIGN humaner dendritischer Zellen (Curtis, Scharnowski &

Watson, 1992), das nicht nur einen ICAM-3-vermittelten Beitrag bei der Stimulierung naiver T-Lymphozyten leistet, sondern darüber hinaus auch in der Lage ist, durch Interaktion mit ICAM-2 Rollen, Adhäsion und Transmigration humaner unreifer dendritischer Zellen zu vermitteln (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Diese erstmals beschriebene  $\beta_2$ -Integrin-unabhängige Interaktion des ICAM-2 könnte möglicherweise der gezielten Rekrutierung speziell der dendritischen Zellen dienen.

Im murinen Modellsystem wurden bisher nur einige wenige Studien zur endothelialen Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen durchgeführt. In vivo Experimente mit reifen murinen dendritischen Zellen zeigten zunächst, dass diese nach subkutaner (s.c.) Injektion bei Mäusen gut in die drainierenden Lymphknoten migrierten, während bei einer intravenösen (i.v.) Applikation keine Migration hierher erfolgte. Demgegenüber migrierte eine Population unreifer dendritischer Zellen nach s.c. Injektion nicht in die drainierenden Lymphknoten (Lappin *et al.*, 1999). Die im Rahmen jener Arbeit nicht beantwortete Frage nach dem Migrationsverhalten unreifer dendritischer Zellen nach i.v. Applikation wurde durch eine Studie der eigenen Arbeitsgruppe aufgegriffen und beantwortet: Unreife, aber nicht reife dendritische Zellen wanderten nach i.v. Injektion in das experimentell entzündete Ohr von Mäusen aus (Pendl *et al.*, 2002). In der gleichen Arbeit konnten E- und P-Selektin als Adhäsionsvermittler für murine dendritische Zellen identifiziert werden. Die unreifen dendritischen Zellen banden zum einen bei Adhäsionsexperimenten sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter Einfluss von Scherkräften an immobilisierte E- und P-Selektin-Fc-Fusionsproteine. Zum anderen führte die Blockade der beiden Selektine durch monoklonale Antikörper in vivo zu einer partiellen, aber signifikanten Reduktion ihrer Migration in die entzündete Haut, war allerdings unabhängig von PSGL-1 (Pendl *et al.*, 2002). Diese E- und P-Selektin-Abhängigkeit konnte über die Speziesgrenze hinweg auch für frisch aus dem peripheren Blut isolierte humane dendritische Zellen belegt werden, die über Kontakte zu den genannten Selektinen am murinen Endothel zu rollen vermochten (Robert *et al.*, 1999).



Darüber hinaus zeigten Grabbe et al., dass sowohl die Auswanderung unreifer muriner dendritischer Zellen in die Haut, als auch die Migration peripherer dendritischer Zellen aus dem Gewebe in die Lymphknoten unabhängig von  $\beta_2$ -Integrinen geschehen (Grabbe *et al.*, 2002). Bis heute wurde jedoch noch nicht untersucht, welcher molekulare Mechanismus für diese  $\beta_2$ -Integrin-unabhängigen Adhäsions- und Transmigrationsvorgänge der murinen dendritischen Zellen verantwortlich sein könnte.

Nimmt man die Daten aus dem humanen und murinen System zusammen, könnte ICAM-2 auch in der Maus, in Verbindung mit einem  $\beta_2$ -Integrin-unabhängigen Interaktionspartner in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein.

## **2.4 Spezielle Untersuchungen zu ICAM-2**

Nach der erstmaligen Beschreibung des humanen ICAM-2 als neuartiges transmembranes Glykoprotein vom Typ-I durch Dustin et al. 1988 (Dustin & Springer, 1988), wurden seine funktionellen Eigenschaften von Staunton et al. 1989 untersucht. Durch Klonierung aus Endothelzellen und Expression in COS-Zellen (Affen-Zelllinie, vgl. Abkürzungen) konnte ICAM-2 zunächst als weiterer wichtiger Ligand für LFA-1 mit hoher Homologie zu Teilen des ICAM-1 Moleküls identifiziert werden (Staunton *et al.*, 1989). ICAM-2 wird von hämatopoetischen Zellen sowie von Endothel- und Epithelzellen exprimiert und konnte darüber hinaus auf einer Reihe muriner Zelllinien nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 1996). Auf unstimuliertem, nicht entzündetem Endothel wird ICAM-2 konstitutiv exprimiert. Die basale Expressionsrate liegt höher als die von ICAM-1, kann jedoch nicht durch Endzündungsmediatoren wie Lipopolysaccharid (LPS), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-1 (IL-1) weiter gesteigert werden (Nortamo *et al.*, 1991). Vielmehr wurde bei Untersuchungen mit HUVEC eine Suppression der ICAM-2 Expression auf ca. 50% nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit TNF- $\alpha$  festgestellt (McLaughlin *et al.*, 1998). Die konstitutive Expression ist vermutlich auf das Fehlen einer Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren im Bereich des ICAM-2-Gens zurückzuführen, wie sie beim ICAM-1-Gen gefunden werden konnte. Klonierung und Expression des murinen ICAM-2 zeigte 60%-ige Identität in der Aminosäuresequenz zwischen humanem und murinem ICAM-2. Die Bindungsfähigkeit des murinen ICAM-2 an humanes LFA-1 legt die Vermutung nahe, dass ICAM-2 über die Artgrenzen hinweg eine bedeutende Funktion inne hat (Xu *et al.*, 1992).

Aufgrund seiner konstitutiven Expression wurde ICAM-2 zunächst eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der homöostatischen Migration der Leukozyten und für die bereits beschriebene Rezirkulation der Lymphozyten beigemessen (de Fougerolles *et al.*, 1991; Dustin & Springer, 1988). Zahlreiche Untersuchungen weisen außerdem darauf hin, dass ICAM-2 neben direkt adhäsiven Eigenschaften auch als regulatives und stimulatorisches Molekül die Leukozytenfunktion beeinflusst, obgleich eine eindeutige und umfassende

Definition der Aufgaben und Funktionen von ICAM-2 bis heute aussteht. Die Arbeitsgruppe um Carl C. Gahmberg isolierte ein Peptid aus der Bindungsregion von humanem ICAM-2, welches in spezifischer Weise sowohl an LFA-1 als auch an Mac-1 bindet (Li *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995). Dieses Peptid ist, wie auch ein lösliches humanes ICAM-2-Fc-Fusionsprotein, in der Lage, die Integrinaffinität humaner T-Lymphozyten für ICAM-1, -2 und -3 zu erhöhen und vermehrte Bindung der Zellen an die immobilisierten ICAM hervorzurufen (Kotovuori *et al.*, 1999). Es induziert außerdem die Migration natürlicher Killerzellen im 'Boyden-chamber-assay' (Somersalo *et al.*, 1995). Weiterhin wurde beobachtet, dass ICAM-2-tranfizierte 'Chinese hamster ovary-cells' (CHO-Zellen) in der Lage sind an immobilisiertem Mac-1 zu binden (Xie *et al.*, 1995). Während die weiter unten vorgestellten Interaktionen zwischen ICAM-2 und LFA-1 gesicherte physiologische Bedeutung haben, konnte die Relevanz der direkten Adhäsion zwischen ICAM-2 und Mac-1 in vivo bis heute weder unter physiologischeren Versuchsbedingungen mit Endothel, noch bei Experimenten am lebenden Tier belegt werden. Demgegenüber kann die aktivierende und regulative Funktion von ICAM-2 als gesichert gelten, da verschiedene andere Gruppen ebenfalls einen ICAM-2-Beitrag zur Regulierung unterschiedlicher T-Zell-Funktionen fanden (Carpenito, Pyszniak & Takei, 1997; Damle, Klussman & Aruffo, 1992). Danach ist nicht nur die Stärke der Aktivierung, sondern auch das lymphozytäre Expressionsmuster bestimmter Zytokine abhängig von der An- bzw. Abwesenheit des ICAM-2 (Bleijs *et al.*, 1999; Salomon & Bluestone, 1998).

Ebenfalls gut belegt ist die Bedeutung von ICAM-2 bei der LFA-1-vermittelten leukozytären Adhäsion und Migration in vitro wie in vivo: Nach eingangs erwähnten ersten Experimenten mit Neutrophilen und Lymphozyten, konnte im Folgenden auch für Monozyten gezeigt werden, dass ICAM-2 über die Bindung an LFA-1 direkte Adhäsion vermitteln kann (Dosquet, Weill & Wautier, 1992).

Im murinen System wiesen ICAM-2-defiziente Tiere nach Induktion einer allergischen Lungenentzündung eine verzögerte Akkumulation von eosinophilen Granulozyten in den bronchialen Luftwegen auf, was auf eine wichtige Funktion des ICAM-2 bei schnellen Immunantworten hinweist (Gerwin *et al.*, 1999).

Durch die funktionelle Blockade mittels monoklonaler Antikörper konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Molekül auch einen Beitrag zur transendothelialen Migration muriner T-Lymphozyten durch murine Endothelien leistet (Reiss & Engelhardt, 1999). In vielen Fällen scheinen sich jedoch die Funktionen von ICAM-1 und ICAM-2 gegenseitig zu ergänzen bzw. zu überlappen: Bei *in vivo* Experimenten konnte die Rezirkulation von Lymphozyten in periphere und mesenteriale Lymphknoten nur durch die gleichzeitige Blockade von ICAM-1 und ICAM-2 signifikant reduziert werden, während die gezielte Ausschaltung nur eines der Integrinliganden ohne Effekt blieb (Lehmann *et al.*, 2003). Die gleiche Beobachtung wurde auch *in vitro* bei Untersuchungen zur Transmigration humaner neutrophiler Granulozyten durch HUVEC gemacht (Issekutz, Rowter & Springer, 1999). Die Differenzierung zwischen ICAM-1- und ICAM-2-Beitrag stand auch bei der Fortführung der oben erwähnten Studien zur Transmigration muriner T-Lymphozyten im Vordergrund. Hierbei wurden die gleichen ICAM-1- und/oder ICAM-2-defizienten murinen Endothelzelllinien verwendet, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen (Lyck *et al.*, 2003). Es fand sich eine nahezu vollständige Reduktion der Migration der T-Lymphozyten durch ICAM-1/ICAM-2-doppelfdefizientes, ruhendes Endothel. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die alleinige Retransfektion von ICAM-2 lediglich eine teilweise, die alleinige Retransfektion von ICAM-1 aber eine komplette Rekonstitution der lymphozytären Transmigration durch Wildtyp-Endothelium erlaubte.

Im humanen System konnte mit DC-SIGN ein  $\beta_2$ -Integrin-unabhängiger Ligand für ICAM-2 und ICAM-3 gefunden werden, für den eine bedeutende Rolle bei der endothelialen Adhäsion und Transmigration humaner dendritischer Zellen beschrieben wird (Geijtenbeek *et al.*, 2000a). Die molekulare Interaktion erfolgt dabei nicht wie bei der Integrinbindung über die Erkennung bestimmter Proteinregionen, sondern über die Bindung an terminale, mannoseähnliche Oligosaccharidketten (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Für die Bedeutung des ICAM-2 für murine dendritische Zellen liegen bis heute keine veröffentlichten Daten vor.

Durch den Einsatz der drei erwähnten ICAM-spezifischen Endothel-Zelllinien (Kap. 3.1.2) war es im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit zum ersten Mal möglich, die Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen in Abhängigkeit der An- bzw. Abwesenheit von endothelialelem ICAM-2 im murinen System zu untersuchen. Welche Fragestellungen dabei im Einzelnen untersucht und beantwortet werden sollten, wird im folgenden Kapitel dargelegt.

## **2.5 Zielsetzung**

Die konstitutive Expression von ICAM-2 auf ruhendem Endothel, seine bisher bekannte Interaktionsfähigkeit mit LFA-1 im murinen und humanen System sowie mit Mac-1 und DC-SIGN nur im humanen System legten die Vermutung nahe, dass ihm auch für die endotheliale Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen eine Bedeutung zukommt. Nachdem in vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe ein funktioneller Beitrag von E- und P-Selektin gefunden werden konnte, sollte im Rahmen dieser Dissertation die Rolle von ICAM-2 mit Hilfe eines murinen Modellsystems definiert werden. Hierbei sollte auch die Frage beantwortet werden, ob ICAM-2 mit einem bekannten Liganden der  $\beta_2$ -Integrin-Familie interagiert oder, wie beim Menschen, ein davon unabhängiger Interaktionsmechanismus besteht.

Dazu musste zunächst ein früher in der Arbeitsgruppe verwendetes Protokoll zur Differenzierung unreifer und reifer dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark wieder aufgebaut werden. Aufgrund der mannigfaltigen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Generierung dendritischer Zellen und der ebenso zahlreichen unterschiedlichen Differenzierungsstufen dieses Zelltyps, sollte zunächst die genaue morphologische und immunzytochemische Charakterisierung der gewonnenen dendritischen Zellen erfolgen. Im Anschluss daran sollten ihre funktionellen Eigenschaften mit Hilfe standardisierter Adhäsions- und Transmigrationsexperimente untersucht werden.

Zu Beginn sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Transmigrationsfähigkeit der hier verwendeten Zellen in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades verändert. Dies sollte durch Transmigrationsexperimente unreifer (Tag 5) und reifer dendritischer Zellen (Tag 9 oder 10) durch Wildtyp-Endothel getestet werden.

Daran anschließend sollte geklärt werden, ob die transendotheliale Migration muriner dendritischer Zellen abhängig von der Gegenwart des ICAM-2 ist. Mit Hilfe dreier muriner Endothelzelllinien, die entweder ICAM-1 und ICAM-2, nur ICAM-2 oder keines der beiden ICAM auf ihrer Oberfläche exprimierten, sollte

der Beitrag von ICAM-2 zur endothelialen Adhäsion und transendothelialen Migration *in vitro* überprüft werden.

Im Rahmen der Transmigrationsexperimente sollte auch die Bedeutung der Interaktion von ICAM-2 mit dem bisher als Bindungspartner bekannten LFA-1 untersucht werden. Neben einem monoklonalen Antikörper zur funktionellen Blockade der leukozytären  $\beta_2$ -Integrine (GAME-46) standen hierzu auch  $\beta_2$ -Integrin-defiziente murine dendritische Zellen zur Verfügung.

Mit den oben genannten Untersuchungen zu ICAM-2 sollte die Rolle eines wichtigen endothelialen Adhäsionsmoleküls für die immunologisch so bedeutsame Leukozytenpopulation der dendritischen Zellen definiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Biologisches Material

#### 3.1.1 Murines Knochenmark

Zur Gewinnung von murinem Knochenmark wurden die in Tab. 3.1 aufgelisteten Mäuse verwendet:

Eigenschaft	Genotyp	Alter	Herkunft/Referenz
Wildtyp	Balb/c	8-14 Wochen	Harlan, Horst, Niederlande
CD18-defizient	129Sv/C57BL6 (H-2 <sup>b</sup> )	8-14 Wochen	(Scharffetter-Kochanek <i>et al.</i> , 1998a)
Wildtyp-Kontrolle	129Sv/C57BL6 (H-2 <sup>b</sup> )	8-14 Wochen	(Scharffetter-Kochanek <i>et al.</i> , 1998a)

**Tab. 3.1 Mäuse.**

Die Tiere wurden in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre getötet, bevor ihnen Knochenmark aus Femur und Tibia der Hinterläufe entnommen wurde (Kap. 3.3). Die CD18-defizienten Mäuse und die 129Sv/C57BL6-(H-2<sup>b</sup>)-Wildtyp-Kontrolltiere wurden freundlicherweise von Prof. S. Grabbe (Universitäts-Hautklinik, Münster) zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.2 Zellen und Kulturmedien

Murine dendritische Zellen wurden für alle gezeigten Experimente frisch nach der in Kap. 3.3 beschriebenen Methode hergestellt.

Die Bezugsquellen der verwendeten Kulturmedien und Zusatzstoffe sind in Tab. 3.2, die eingesetzten Zelllinien in Tab. 3.3 aufgeführt.



Medium / Zusatzstoff	Abkürzung	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
$\alpha$ – Modified Eagle's medium	$\alpha$ -MEM	s.o.
Glutamin	Gln	s.o.
Streptomycin	Strep	s.o.
Penicillin	Pen	s.o.
Natrium-Pyruvat	Na-Pyruvat	s.o.
nicht-essentielle Aminosäuren	NAA	s.o.
$\beta$ -Mercaptoethanol	$\beta$ -Me	s.o.
Geneticin	Gene	PAA, Linz, Österreich
Puromycin	Puro	Merck Biosciences, Schwalbach

Tab. 3.2 Zellkulturmedien und Zusatzstoffe.

Zelllinie (Referenz)	Beschreibung	Medium	Bedingungen
Murine Gehirnen- Endothelioma:		DMEM 10% FCS 2mM Glutamin 1mM NaPyruvat	37°C 95% Luftfeuchte, 10% CO <sub>2</sub>
<b>bEnd5</b> (Bussolino <i>et al.</i> , 1991)	Wildtyp	1mM NaPyruvat 1% nicht-essentielle Aminosäuren	Splitting: 1:3 Zyklus: 14d
<b>bEnd1/2.1 RL</b> (Lyck <i>et al.</i> , 2003)	ICAM-1/-2 defizient	10.000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	
<b>bEnd1/2.1-I2 B1*</b> (Lyck <i>et al.</i> , 2003)	ICAM-2 retransfiziert,	50nM $\beta$ -Mercaptoethanol *zusätzlich: 1,5mg/ml Puromycin	
<b>ICAM-1-Fc-CHO</b> (AG Vestweber, Blanks, J.E.)	m-ICAM-1-Fc- exprimierende CHO-Zellen (Chinese hamster ovary-cells)	$\alpha$ -MEM 10% FCS 2mM Glutamin 10.000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin 0,8mg/ml Geneticin	37°C 95% Luftfeuchte, 10% CO <sub>2</sub>  Splitting: 1:3 Zyklus: 2-3 d
<b>WEHI-3B</b> (ATCC, Rockville, Maryland, USA)	IL-3 produzierende murine myelomonozytäre Zelllinie	DMEM 10% FCS 2mM Glutamin 1mM NaPyruvat 10.000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	37°C 95% Luftfeuchte, 10% CO <sub>2</sub>  Splitting: 1:3 Zyklus: 48h
<b>32Dcl3</b> (ATCC, Rockville, Maryland, USA)	murine myelodie Zelllinie	DMEM 20% h.i. FCS (hitzeinaktiviert) 10% WEHI-3B-Überstand 2mM Glutamin 10.000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	37°C 95% Luftfeuchte, 10% CO <sub>2</sub>  Splitting: 1:5 Zyklus: 48h

Tab. 3.3 Zelllinien.

### 3.1.3 Antikörper

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen die in Tab. 3.4 aufgeführten Antikörper zum Einsatz.

Antigen	Spezies	Isotyp	Klon	Hersteller
CD3	ha- $\alpha$ -m	IgG	145r2C11	Becton Dickinson, Heidelberg
CD11a	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	M17/4	s.o.
CD11b	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	M1/70	s.o.
CD11c	ha- $\alpha$ -m	IgG	HL3	s.o.
CD11c	ha- $\alpha$ -m	FITC-IgG	HL3	s.o.
CD16/32	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	2.4G2	s.o.
CD18	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>1</sub>	GAME-46	s.o.
CD18	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	M18/2	s.o.
CD19	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	1D3	s.o.
CD40	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	3/23	s.o.
CD80	ha- $\alpha$ -m	IgG <sub>2</sub>	16-10-A1	s.o.
CD86 (B.7-2)	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	PO3	s.o.
CD86 (B.7-2)	rat- $\alpha$ -m	FITC-IgG <sub>2a</sub>	PO3	s.o.
DEC-205	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	NLDC-145	BMA, Augst, Schweiz
I-A <sup>d</sup> /I-E <sup>d</sup> (MHC-II)	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	2G9	Becton Dickinson, Heidelberg
I-A <sup>d</sup> /I-E <sup>d</sup> (MHC-II)	rat- $\alpha$ -m	PE-IgG <sub>2a</sub>	2G9	Becton Dickinson, Heidelberg
ICAM-1	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	YN1.1	D. Vestweber
ICAM-2	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	3C4	Becton Dickinson, Heidelberg
Ly-6G (Gr-1)	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2b</sub>	RB6-8C5	s.o.
NK1.1	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	PK136	s.o.
PSGL-1	rat- $\alpha$ -m	IgG <sub>2a</sub>	4RB12	D. Vestweber
<b>Isotyp-Kontrolle / Sekundärantikörper</b>				
Isotyp-Kontrolle	rat	IgG <sub>2a</sub>	R35-95	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle, FITC-konjugiert	rat	IgG <sub>2a</sub>	R35-95	s.o.
Isotyp-Kontrolle, PE-konjugiert	rat	IgG <sub>2a</sub>	R35-95	s.o.
ha-IgG FITC-konjugiert	m- $\alpha$ - ha	IgG <sub>1</sub>	G70-204, G94-90.5	s.o.
rat-IgG+IgM FITC-konjugiert	goat- $\alpha$ -rat	Fab <sub>2</sub> - fragment		Jackson Immunoresearch, West Grove, USA
rat-IgG+IgM PE-konj.	goat- $\alpha$ -rat	Fab <sub>2</sub> - fragment		s.o.
rat-IgG+IgM PO-konjugiert	goat- $\alpha$ -rat	Fab <sub>2</sub> - fragment		s.o.

**Tab. 3.4 Liste der verwendeten Antikörper.**

Abkürzungen: rat=Ratte, m=Maus, ha=Hamster, goat=Ziege, h=Mensch, FITC = Fluorescein-Isothiozyanat, PE = Phycoerythrin, PO = Peroxidase.

### 3.2 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen fanden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturarbeitsbank statt. Die Zellen wurden, wenn nicht anders bezeichnet, in Zellkulturschalen bzw. Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Ablösen und Umsetzen der konfluierend und adhäsiv wachsenden Endotheliome wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml temperaturadaptiertem PBS (37°C) gewaschen und je nach Größe des Kulturgefäßes mit 2-5 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt, bis sie sich durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Platte lösen ließen. Die nach Zentrifugation in Nährmedium resuspendierten Zellen, wurden dann in neue Kulturschalen überführt oder zur späteren Verwendung kryokonserviert. Wenn nicht anders bezeichnet, wurden im Folgenden die unten aufgeführten Standardmaterialien benutzt:

#### Materialien:

Zellkulturarbeitsbank	(BDK Luft- und Raumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen)
Inkubator	Heraeus Typ BB 6220 CU (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge	Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau); Raumtemperatur, 5 min, 1200 rpm
Plastikröhrchen	15 ml / 50 ml (Corning Inc., Corning, USA)
Zellkulturschalen	90 mm Ø / 130 mm Ø (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg)
	6- / 96-Lochplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg)
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> / 80 cm <sup>2</sup> Grundfläche (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg)
Kryoröhrchen	2 ml (NUNC, Wiesbaden)
FCS	Fetal Calf Serum (PAN Biotech, Aidenbach)
PBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline (Biochrom, Berlin)
HBSS	Hanks' balanced salt solution (Biochrom, Berlin)
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin / 0,02% Ethylendiamintetraessigsäure (Biochrom, Berlin)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Röth, Karlsruhe)
Natrium-Azid	(Merck, Darmstadt)

#### 3.2.1 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

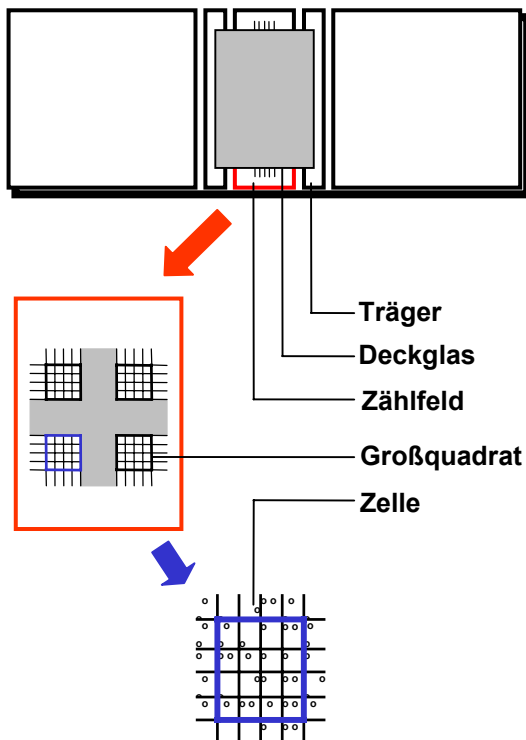
Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben in Suspension gebracht. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation pelletiert und in 1,8 ml FCS/10%DMSO resuspendiert. Die Suspension wurde dann unverzüglich in kältebeständige 2 ml Kryoröhrchen überführt, bei -80°C eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff bei -196°C bis zum Auftauen gelagert.

### 3.2.2 Auftauen von eukaryotischen Zellen nach Kryokonservierung

Zum Auftauen wurden die tiefgefrorenen Kryoröhrchen direkt in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Jedes Röhrchen wurde geschwenkt, bis sich nur noch ein kleiner Eisklumpen darin befand. Dann wurde der Inhalt zu 10 ml 37°C warmem Kulturmedium gegeben und die darin befindlichen Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in der gewünschten Menge Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturschale überführt.

### 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zahl der in einer Suspension befindlichen Zellen zu bestimmen, wurden zunächst 15 µl der Suspension mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 (Verdünnungsfaktor = 2) gemischt. Lebende Zellen schleusen den verwendeten Farbstoff aktiv aus und erscheinen daher im Lichtmikroskop weiß in bläulicher Umgebung. Tote Zellen setzen der Diffusion des Farbstoffs durch die Plasmamembran keinen nach außen gerichteten Transport entgegen und werden tiefblau angefärbt. 10µl der so gefärbten Suspension wurden in eine



Zählkammer nach Neubauer (Brand, Wertheim; Abb. 3.1) mit Kammerfaktor =  $10^4/\text{ml}$  überführt. Durch Auflegen des Deckglases auf die angefeuchteten Träger und die in die Zählfelder eingravierten Linien ergibt sich ein definiertes Volumen, in dem die Lebendzellzahl der Suspension durch Auszählung von z.B. vier Großquadraten unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen) bestimmt werden kann. Mit Hilfe folgender Formel errechnet sich die Zahl der lebenden Zellen pro ml Suspension:

Abb. 3.1 Zählkammer nach Neubauer.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$$

### 3.2.4 Cytospin

Um die Morphologie der kultivierten dendritischen Zellen mikroskopisch untersuchen zu können, wurde ein Teil der Zellen am Tag der funktionellen Experimente mit Hilfe einer Cytospin-Vorrichtung auf einen Objektträger aufgebracht und nach der Färbevorschrift der Diff-Quik<sup>®</sup>-Zellfärbung angefärbt. Pro untersuchter Zellkultur wurden dazu bei Raumtemperatur zwei verschieden konzentrierte Zellsuspensionen in PBS angefertigt ( $0,333 \times 10^6$  und  $0,533 \times 10^6$  Zellen/ml) und davon jeweils 150  $\mu$ l (entsprechend 50.000 bzw. 80.000 Zellen) auf die Cytospin-Vorrichtung aufgebracht. Nach Zentrifugation für 10 min bei 700 rpm folgte die Diff-Quik<sup>®</sup>-Färbung nach den Angaben des Herstellers und die Auswertung unter dem Lichtmikroskop.

#### Spezielle Materialien:

Cytospin-Anlage	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)
Diff-Quik <sup>®</sup> -Färbelösungen	(Dade Behring, Marburg)
Lichtmikroskop	Axiovert 100 (Zeiss, Oberkochen)

### 3.2.5 Zellfärbungen

#### 3.2.5.1 Färbung dendritischer Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff

Die dendritischen Zellen, die für Adhäsionsexperimente eingesetzt wurden, mussten zu Beginn der Versuche mit einem fluoreszierenden Farbstoff für lebende Zellen eingefärbt werden, um sie später unter dem Fluoreszenzmikroskop detektieren zu können. Hierzu wurden die benötigten dendritischen Zellen aus den Kulturgefäßen entnommen und in 5 ml Kulturmedium für dendritische Zellen (DC-Medium, Zusammensetzung siehe Kap. 3.3) resuspendiert. Die Suspension wurde für 45 min im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 2  $\mu$ l einer Fluoreszenzfarbstofflösung (5 mM) pro Milliliter DC-Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in der für die Adhäsionsexperimente benötigten Menge HBSS (37°C) resuspendiert. Die Zellen konnten dann im nächsten Schritt für die funktionellen Experimente verwendet werden (Kap. 3.6.2).

#### Spezielle Materialien:

Fluoreszenzfarbstoff	CellTracker <sup>®</sup> Green CMFDA, MoBiTec, Göttingen
----------------------	--

### 3.2.5.2 Färbung der Endothelzellrasen mit Filipin

Um den lückenlosen Schluss des Endothelzellrasen über dem Porenfilter des Filtereinsatzes für die Transmigrationsexperimente (Kap. 3.6.3) zu überprüfen, wurden diese nach Ende des Versuches mit Filipin angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Durch die bevorzugte Anfärbung der Zellmembranen durch Filipin werden die Grenzen der einzelnen Zellen und damit auch Unterbrechungen des Endothelzellrasens sichtbar.

Zunächst wurden die Filtereinsätze nach erfolgter Transmigration dreimal mit 200 µl PBS gewaschen und so von lose haftenden dendritischen Zellen befreit. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch 20 minütige Zugabe von 50 µl Paraformaldehyd (4%). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde den Filtern für 10 min 50 µl Ammoniumchlorid (50 mM) zum Quenchen (Abfangen freier Radikale) zugegeben. Danach wurde wiederum dreimal gewaschen und für 45 min 50 µl einer Filipin-Lösung unter Lichtabschluss zugegeben. Zuletzt wurden die Filter erneut dreimal mit PBS gewaschen, mit Hilfe einer Ausstanzvorrichtung aus den Filtereinsätzen herausgeschnitten und in 'fluorescence mounting medium' auf einem Objektträger eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit einem Fluoreszenzfilter von 360 nm.

#### Spezielle Materialien:

Filipin-Lösung:	50µg/ml Filipin III (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in PBS / 2% bovine serum albumine (BSA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Paraformaldehyd	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Ammoniumchlorid	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
'Mounting-Medium'	'Fluorescence mounting medium' (DAKO, Hamburg)
Mikroskop	Axiovert 100 (Zeiss, Oberkochen)

### ***3.3 Gewinnung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark***

Zur Gewinnung murinen Knochenmarks wurden zwei bis vier Mäuse pro Präparation eingesetzt. Die Tiere wurden zunächst in Kohlendioxidatmosphäre getötet und anschließend äußerlich durch Eintauchen in 70%-iges Ethanol desinfiziert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen an der Zellkulturarbeitsbank.

Nach Häutung der unteren Extremitäten wurden Femur und Tibia frei präpariert, von Muskulatur und Sehnen befreit und nach Entnahme in PBS/1%FCS aufbewahrt. Anschließend wurde mit Hilfe einer 20 ml Spritze und einer 28G Kanüle das Knochenmark mit PBS/1%FCS aus den Markräumen gespült und in einem 50 ml Plastikröhrchen gesammelt. Durch heftiges pipettieren mit einer 10 ml Stabpipette konnten die oft vorhandenen Knochenmarkszylinder zerstört werden, so dass eine homogene Zellsuspension entstand. Nach Zentrifugation wurde das Pellet zur osmotischen Zerstörung von Erythrozyten in 3 ml hypotonem Lysepuffer resuspendiert und für drei Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde 5 ml Kulturmedium für dendritische Zellen (DC-Medium) zugegeben und die Suspension durch ein Nylon-Zellsieb mit 70 µm Porengröße gespült. Das Sieb wurde einmal mit der gleichen Menge PBS/1%FCS gewaschen und die aufgefangene Suspension erneut zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets wurden die Zellen in 10 ml DC-Medium in einer 90 mm Zellkulturschale pro eingesetzter Maus ausgesät und für zwei Stunden im Brutschrank (37°C, 95% Luftfeuchte, 10% CO<sub>2</sub>) inkubiert, wodurch sich adhäsive Zellen der Kultur am Boden der Kulturplatte abschieden. Die nicht adhärenen Zellen wurden anschließend durch behutsames Spülen mit dem in den Schalen enthaltenen Medium suspendiert, entnommen und wie in Kap. 3.2.3 beschrieben gezählt. 30x10<sup>6</sup> der so erhaltenen Zellen wurden in 30 ml DC-Medium in 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und im Brutschrank (37°C, 95% Luftfeuchte, 10% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Am Tag 3 der Kultur wurden zwei Drittel des Kulturmediums durch frisches DC-Medium ersetzt.

**Spezielle Materialien:**

Ethanol	(J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
Nylon-Zellsieb	Porengröße 70 µm (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
Paraformaldehyd	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

## Lysepuffer:

4,15g NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
0,5g KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)
1,85mg EDTA-Dinatriumsalz	(Roth, Karlsruhe)
ad 500ml ddH <sub>2</sub> O	

## DC-Medium:

RPMI-Medium	(PAA, Linz, Österreich)
5% FCS	(PAA, Linz, Österreich)
4% IL-4-konditioniertes Medium	(Labor Grabbe, Münster)
4% GM-CSF-konditioniertes Medium	(Labor Grabbe, Münster)
1% nicht-essentielle Aminosäuren	(Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
0,1% Gentamicin	(Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
1 mM Glutamin	(Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
50 nM β-Mercaptoethanol	(Gibco Life Technologies, Karlsruhe)

**3.3.1 Herstellung unreifer dendritischer Zellen**

Die oben beschriebenen Kulturbedingungen wurden bis Tag 5 fortgesetzt. Zum Ernten der unreifen dendritischen Zellen wurde der Überstand der Flaschen vorsichtig auf und ab pipettiert, entnommen und in einem dem Volumen entsprechenden Plastikröhrchen gesammelt. Der Phänotyp der zu diesem Zeitpunkt unreifen dendritischen Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (Kap. 4.1.1).

**3.3.2 Herstellung reifer dendritischer Zellen**

An Tag 6 der oben beschriebenen Kultur wurden die nicht adhärenen Zellen durch vorsichtiges pipettieren des Überstandes abgenommen. Die entnommene Suspension wurde zentrifugiert und das entstandene Pellet in frischem DC-Medium resuspendiert. Pro 80 cm<sup>2</sup>-Flasche wurden jetzt ca. 15x10<sup>6</sup> Zellen in 30 ml DC-Medium ausgesät. Nach weiteren ein bis zwei Tagen wurde den Kulturen Lipopolysaccharid (100 ng/ml) zugesetzt, um die dendritischen Zellen zur endgültigen Ausreifung zu bringen. An Tag 9 oder 10 konnten so phänotypisch reife dendritische Zellen geerntet werden (Kap. 4.1.1).

**Spezielle Materialien:**

Lipopolysaccharid	LPS, gewonnen aus Escherichia coli (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
-------------------	---



### 3.4 Aufreinigung von ICAM-1-Fc-Fusionsprotein

Zur Gewinnung von Maus-ICAM-1-Fc-Fusionsproteinen waren in der Arbeitsgruppe bereits stabil transfizierte 'Chinese hamster ovary-cells' (CHO-Zellen, Tab. 3.3) hergestellt worden, die dieses Konstrukt in das Medium sezernieren (AG Vestweber, J. E. Blanks, unveröffentlicht). Diese Zellen wurden 7 Tage in Roller-Flaschen in  $\alpha$ -MEM, 10% FCS, Glutamin, Pen/Strep, 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Der Kulturüberstand (500 ml je Flasche) wurde im Anschluss daran zur Abtrennung von Zelltrümmern 20 min mit 6500 rpm bei 4°C in einer Varifuge 3.0 (Haereus, Hanau) zentrifugiert und dann durch einen Filter mit 0,2  $\mu$ m Porengröße steril filtriert. Zur Affinitätsaufreinigung wurde der Überstand in einer Amicon<sup>®</sup>-Anlage auf 1/5 Volumen eingengt und auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von je 250  $\mu$ l mit Protein-A-Sepharose überzogener beads (PAS-beads) wurde der Überstand über Nacht bei 4°C rotiert und im Anschluss bei 3000 rpm und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Die pelletierten PAS-beads wurden in eine Waschsäule überführt und mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Die über den Fc-Teil an die Protein A-Sepharose gebundenen Fusionsproteine wurden im folgenden Schritt mit 3 ml 0,1 M Glycin/HCl pH 3,5 eluiert und in 500  $\mu$ l Fraktionen mit 30  $\mu$ l 1 M Tris-Puffer pH 9,5 neutralisiert. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines Photometers bei 280 nm Wellenlänge bestimmt. Dabei ist die optische Dichte (OD) ein Maß für den Proteingehalt (OD: 1,4 = 1 mg Protein/ml). Die proteinreichen Fraktionen wurden gepoolt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Reinheit und tatsächliche Konzentration des Fusionsproteins in der aufgereinigten Lösung wurde über eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Kap. 3.4.1) kontrolliert.

#### Spezielle Materialien:

Roller-Flaschen	(Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg)
Amicon <sup>®</sup> -Anlage	(Millipore, Schwalbach)
PAS-beads	Protein-A-Sepharose-Beads (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
Waschsäule	Econocolumn (Bio-Rad, München)
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Glycin	(J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
Waschpuffer:	
30 mM Tris	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
HCl pH 8,4, 130 mM NaCl, 0,04% Natrium-Azid	(Merck, Darmstadt)

### 3.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Beurteilung von Molekulargewicht und Reinheit der gewonnenen Fusionsproteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard eingesetzt.

Hierzu wurden 8%-ige Sammel- und Trenngele (Tab. 3.5) verwendet, die in einer Elektrophoreseeinheit vorbereitet wurden. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden zur Denaturierung mit 1/5 Volumen 6-fach reduzierendem Probenpuffer (Tab. 3.6) versetzt, für 5-7 min aufgekocht und in die Sammelgeltaschen eingebracht. Bei jeder SDS-PAGE wurde 1  $\mu$ l Molekulargewichtsmarker in einer Spur mitgeführt. Für die Sammelgelelektrophorese wurde zunächst eine Spannung von 90 Volt angelegt, die bei Erreichen des Trenngels auf 150 Volt erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde kurz vor Austritt der Banden aus dem Trenngel gestoppt. Dann wurde das Gel aus der Laufkammer entnommen und nach Coomassie angefärbt (Kap. 3.4.2).

	Sammelgel 8%	Trenngel 8%
H <sub>2</sub> O	4,78 ml	3,05 ml
1,5 M Tris (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) / HCl (Merck, Darmstadt), pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) / HCl (Merck, Darmstadt), pH 6,8	-	1,25 ml
30% Acrylamid/Bis (Roth, Karlsruhe)	2,67 ml	0,65 ml
10% SDS (Merck, Darmstadt)	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
10% (w/v) APS (Bio-Rad, München)	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED (Serva, Heidelberg)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
<b>6fach reduzierender Probenpuffer</b>	<b>Laufpuffer</b>	
1 g SDS (Merck, Darmstadt)	144 g Glycin (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)	
3,8 g Glycerol (Merck, Darmstadt)	30 g Tris (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	
0,93 g DTT (Boehringer, Mannheim)	10 g SDS (Merck, Darmstadt)	
2,4 mg Bromphenol-Blau (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	H <sub>2</sub> O ad 1 l	
7 ml Tris (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) /HCl (Merck, Darmstadt) pH 6,8		

**Tab. 3.5 Zusammensetzung der Gele und Puffer für die SDS-PAGE.**

**Spezielle Materialien:**

Elektrophoreseeinheit	Mini-Protean II (Bio-Rad, München)
Molekulargewichtsmarker	Broad Range (Bio-Rad, München)
Bovines Serumalbumin	BSA 96% (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

**3.4.2 Coomassie Färbung**

Mit Hilfe der Coomassie Färbung ließen sich die Proteinbanden nach der SDS-PAGE sichtbar machen. Hierzu wurde das Gel für 30 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend mit Entfärbelösung solange behandelt, bis lediglich die angefärbten Proteinbanden als blaue Streifen sichtbar blieben (Tab. 3.6).

Zur Konservierung und anschließenden Auswertung der Gele wurden diese zunächst getrocknet und dann in Plastikfolie eingeschweißt.

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	<b>Entfärbelösung</b>
50 ml Essigsäure (Roth, Karlsruhe)	40% Ethanol
225 ml Methanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)	(J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
1,25 g Coomassie R 250 (Merck, Darmstadt)	10% Essigsäure (Roth, Karlsruhe)
225 ml ddH <sub>2</sub> O	50% H <sub>2</sub> O

**Tab. 3.6 Zusammensetzung der verwendeten Färbe- und Entfärbelösung.**

## **3.5 Immunologische Methoden**

### **3.5.1 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorter) dient der Untersuchung von Zellen und Zellpopulationen im Hinblick auf Zellgröße, Granularität sowie auf die Expression bestimmter (Oberflächen-) Moleküle. Dazu werden in einem FACS-Gerät die Zellen einer Zellsuspension einzeln in einer Kapillare an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und vermessen. Während Größe und Granularität der Zellen direkt aus der Extinktion bzw. der Streuung des Laserstrahls vom Gerät berechnet werden, bedarf es zur Detektion bestimmter Oberflächenmoleküle einer Vorbehandlung mit spezifischen Antikörpern. Diese sind entweder direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, oder ein fluoreszierender sekundärer Antikörper bindet an den Fc-Teil des molekülspezifischen primären Antikörpers. Die vom Gerät detektierte Fluoreszenzintensität steht in Relation zur Menge des gebundenen Antikörpers und ist damit ein Maß für den Expressionslevel des untersuchten Moleküls. Um falsch negative und falsch positive Detektionen zu vermeiden, werden bei jeder Untersuchung sogenannte Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt: Zur Positivkontrolle verwendet man einen Antikörper, der sicher an den zu untersuchenden Zellen bindet und in jedem Fall eine positive Fluoreszenz hervorrufen muss. Zur Negativkontrolle bedient man sich solcher Antikörper, deren Epitop nicht auf den Zellen zu finden ist (Isotyp-Kontrollantikörper).

Sowohl die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten dendritischen Zellen, wie auch die Endotheliome wurden mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Dendritische Zellen wurden im nativen Zustand eingesetzt. Die Endotheliome wurden sowohl im nativen Zustand, teilweise aber auch nach Aktivierung mittels Tumor-Necrosis-Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) getestet. In diesen Fällen wurde dem Kulturmedium der Endotheliome 20 Stunden vor Beginn der FACS-Untersuchung TNF- $\alpha$  in einer Endkonzentration von 5 nM zugegeben.

Die untersuchten Zellen wurden, wie unter 3.2 beschrieben aus ihren Kulturgefäßen entnommen und einmal mit 4°C kaltem FACS-Puffer gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde eine Suspension mit  $1 \times 10^7$  Zellen/ml FACS-Puffer hergestellt, von der jeweils 50 µl (entsprechend ca.  $5 \times 10^5$  Zellen) in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte gegeben wurden. Nach Zugabe von je 1 µg der in Kap. 3.1.2 bezeichneten Primärantikörper erfolgte eine Inkubation für 20 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl FACS-Puffer gewaschen und nach erneuter Aufnahme in 50 µl Puffer mit 0,5-1 µg des entsprechenden Sekundärantikörpers versetzt. Nach 20minütiger Inkubation wurden sie wiederum mit je 200 µl Puffer gewaschen, anschließend in 100 µl Cell-Fix<sup>®</sup>-Lösung fixiert und in 0,6 ml-FACS-Röhrchen überführt. Danach erfolgte die Spülung der Vertiefung der Lochplatte mit je 150 µl Puffer zur Aufnahme der verbliebenen Zellen, die ebenfalls dem FACS-Röhrchen zugegeben wurden. Die Messung der Proben und die Auswertung wurden am FACS-Gerät durchgeführt.

**Spezielle Materialien und Geräte:**

TNF-α	Tumor-Necrosis-Factor-α (TEBU, Frankfurt am Main)
FACS-Puffer	PBS/1%FCS/0,04%Na-Azid
Cell-Fix <sup>®</sup> -Lösung	Cell-Fix <sup>®</sup> -Konzentrat 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnt (Becton-Dickinson, Heidelberg)
FACS-Gerät	FACS Calibur <sup>®</sup> (Becton-Dickinson, Heidelberg)
FACS-Röhrchen	(Becton-Dickinson, Heidelberg)

### 3.5.2 Cell-surface-ELISA

Der cell-surface-ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) ist eine Methode zur Beurteilung des Expressionslevels von Zelloberflächenmolekülen. Die Zellen werden dazu mit einem primären Antikörper gegen das gesuchte Molekül inkubiert, welcher von einem enzymgekoppelten sekundären Antikörper erkannt wird. Je nach Menge der gebundenen Antikörper wird dann in einem weiteren Schritt durch das gekoppelte Enzym eine Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität mit einem Photometer gemessen werden kann. Die detektierte optische Dichte ist ein Maß für den Expressionslevel des gesuchten Moleküls. Ähnlich wie bei der FACS-Analyse sind auch bei dieser Methode Kontrolluntersuchungen notwendig, um falsch positive und falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des cell-surface-ELISA die Endotheliome auf ihre Expression von ICAM-1 bzw. ICAM-2 untersucht. Dazu wurden die Zellen in gleicher Weise wie für die Adhäsionsexperimente in 96-Lochplatten ausgesät und nach 48 Stunden verwendet (Kap. 3.6.2). Die Endotheliome, die mit ICAM-1-Antikörper inkubiert werden sollten, wurden 20 Stunden zuvor durch Zugabe von TNF- $\alpha$  stimuliert (Endkonzentration im Medium: 5 nM). Der gesamte Versuch wurde auf Eis und mit 4°C kalten Lösungen durchgeführt. Nach Dekantieren des Kulturmediums wurden pro Endotheliom je drei Vertiefungen der 96-Lochplatte mit 1  $\mu$ g Primärantikörper in 100  $\mu$ l DMEM/10%FCS für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Monolayer dreimal mit je 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Dann folgte die Fixierung der Zellen mit 50  $\mu$ l 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min und anschließend erneutes dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit PBS. Nun wurde allen Ansätzen für 30 min der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper (1  $\mu$ g/100  $\mu$ l PBS) zugegeben und die Lochplatte gegen Lichteinfall abgedeckt. Danach wurden die Vertiefungen fünfmal mit je 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach erneutem Dekantieren des Puffers wurden unter Lichtschutz je 100  $\mu$ l eines Entwicklungspuffers zugegeben, dessen Reaktion nach 60 Sekunden durch Zugabe von 50  $\mu$ l 3 M HCl gestoppt wurde. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die photometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von 492 nm.

#### Spezielle Materialien:

Photometer	Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) Emax precision microplate reader (Molecular Devices, München)
Software	Softmax <sup>®</sup> 2.35 (Molecular Devices, München)
TNF- $\alpha$	Tumor-Necrosis-Factor- $\alpha$ (TEBU, Fankfurt am Main)
3M HCl	Salzsäure (Merck, Darmstadt)

#### Primärantikörper:

1. rat-anti-mouse ICAM-1 (YN1.1)
2. rat-anti-mouse ICAM-2 (3C4)
3. Isotyp-Kontrolle rat

#### Sekundärantikörper:

1. Peroxidase-konjugierter  
goat-anti-rat IgG (H+L)-Antikörper

#### Entwicklungspuffer ad 50ml H<sub>2</sub>O:

2,5 ml 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
1,25 ml 1M Zitronensäure	(Merck, Darmstadt)
30 mg OPD	o-Phenyldiamin Dihydrochlorid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
40 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Roth, Karlsruhe)

### **3.6 Funktionelle Experimente in vitro**

Mit Hilfe der in diesem Kapitel beschriebenen funktionellen Experimente sollten in vitro die Adhäsions- und Transmigrationseigenschaften der dendritischen Zellen untersucht werden. Adhäsionsexperimente mit reifen dendritischen Zellen wurden auf Grund ihrer nahezu nicht vorhandenen Transmigrationsfähigkeit (Kap. 4.3.1) nicht durchgeführt.

#### **3.6.1 Adhäsionsexperimente mit immobilisierten Fusionsproteinen**

Die Adhäsionseigenschaften der unreifen dendritischen Zellen wurden mit Hilfe von immobilisierten Fusionsproteinen aus murinen Adhäsionsmolekülen und dem Fc-Teil von humanem Immunglobulin G<sub>1</sub> (hIgG<sub>1</sub>) untersucht. Es standen die folgenden Proteine zur Verfügung:

1. P-Selektin-Fc-Fusionsprotein (Hahne *et al.*, 1993)
2. ICAM-1-Fc-Fusionsprotein (AG Vestweber, J. E. Blanks, unveröffentlicht)

Als Kontrollprotein ohne Adhäsionsmolekülkomponente wurde humanes IgG<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Als Kontrollzelllinie zur Sicherung der Funktionalität des ICAM-1-Fc-Fusionsproteins standen 32Dcl3-Zellen zur Verfügung (Kap. 3.1.2).

Zur Immobilisierung der bezeichneten Proteine am Boden der Vertiefungen einer 96-Lochplatte wurden Coating-Lösungen in einer Konzentration von 20 µg Fusionsprotein/ml HBSS hergestellt. Pro untersuchter Zellart wurden in Dreifachansätzen je 50 µl dieser Lösungen für eine Stunde bei 37°C in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurde der Inhalt verworfen und für wiederum eine Stunde bei 37°C durch je 200 µl DMEM/10%FCS/0,04%Na-Azid ersetzt. Danach wurden die Vertiefungen zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen und bis zum Versuchsbeginn bei 4°C im Kühlschrank verwahrt. Wie in vorangehenden Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, kann durch die beschriebene Behandlung die Versuchsplatte mit Fusionsprotein überzogen werden, wobei gleichzeitig unspezifisches Binden der Leukozyten am Plastik verhindert wird (AG Vestweber, K. Lühn).

Die eingesetzten Zellen (Kap. 3.1.2) wurden aus ihren Kulturgefäßen entnommen, zweimal mit 4°C kaltem HBSS gewaschen und in der benötigten

Menge ( $5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l HBSS / Vertiefung) bereitgestellt. Dann wurde den Zellsuspensionen für 10 min bei 4°C je 1  $\mu$ g anti-CD16/32-Antikörper (Kap. 3.1.2) pro  $10^6$  Zellen zugegeben, um unspezifische Bindungen über die Fc-Rezeptoren der Zellen am Fc-Teil des Fusionsproteins zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen in die zuvor entleerten Vertiefungen der vorbereiteten Lochplatte gegeben und auf einem horizontalen Schüttler für 20 min bei 60 rpm auf Eis mit den immobilisierten Fusionsproteinen inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Zellen durch mehrmaliges Waschen mit je 200  $\mu$ l 4°C kaltem HBSS mit Hilfe einer Multichannel-Pipette vorsichtig aus den Vertiefungen herausgespült. Die verbliebenen Zellen wurden dann mit je 200  $\mu$ l 2%-igem Glutaraldehyd in HBSS auf den Platten fixiert. Die einzelnen Versuchsansätze wurden im Anschluss unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung betrachtet. Im Zentrum der Vertiefungen wurde eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> mit Hilfe einer Digitalkamera fotografiert und am Computer unter Verwendung der Scion Image<sup>®</sup>-Software die Zahl der gebundenen Zellen ermittelt.

#### Spezielle Materialien:

96-Lochplatte	Maxisorp <sup>®</sup> (NUNC, Wiesbaden)
Horizontaler Schüttler	Swip (E. Bühler)
Glutaraldehyd	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Lichtmikroskop	Axiovert 100 (Zeiss, Oberkochen)
Digitalkamera	S/W-CCD-Kamera (AVT-Horn, Aalen)
Computer	Power Macintosh 7100/80 (Apple Computer, Cupertino, CA, USA)
Scion Image <sup>®</sup> -Software	Version 1.5 ( <a href="http://www.nist.gov/lispix/imlab/prelim/dnld.html">http://www.nist.gov/lispix/imlab/prelim/dnld.html</a> )

### 3.6.2 Adhäsionsexperimente mit Endothel

Durch die im Folgenden beschriebenen Adhäsionsexperimente mit unreifen dendritischen Zellen an murinen Endothelioma sollte die Abhängigkeit ihrer Adhäsion von der Gegenwart des ICAM-2 auf der Endothelzelloberfläche untersucht werden. Die unreifen dendritischen Zellen wurden zunächst wie in Kap. 3.2.5 beschrieben mit Fluoreszenzfarbstoff eingefärbt, um sie bei der späteren digitalen Auszählung von den Endothelzellen unterscheidbar zu machen. Sie wurden schließlich in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml HBSS (37°C) aufgenommen und bereitgestellt.



Die drei eingesetzten und in Kap. 3.1.2 näher bezeichneten murinen Endothelioma wurden nach einer Kulturzeit von 10 bis 14 Tagen, 48 Stunden vor Versuchsbeginn, aus ihren Kulturgefäßen herausgelöst (Kap. 3.2) und zu jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen in 200  $\mu$ l Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-Lochplatte zur Ausbildung eines Endothelzellrasens ausgesät. Die Integrität des Zellrasens wurde vor jedem funktionellen Experiment unter dem Lichtmikroskop überprüft. Darüber hinaus wurden die in Kap. 3.5 beschriebenen Kontrolluntersuchungen bezüglich der ICAM-1- und ICAM-2-Expression der Endotheliome durchgeführt und so die erwartete Verteilung von ICAM-1 und ICAM-2 sichergestellt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen, das Kulturmedium dekantiert und die Endothelzellrasen einmal mit je 200  $\mu$ l 37°C warmem HBSS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 50  $\mu$ l HBSS bedeckt und jeweils  $5 \times 10^5$  der vorbereiteten dendritischen Zellen in weiteren 50  $\mu$ l HBSS zugegeben.

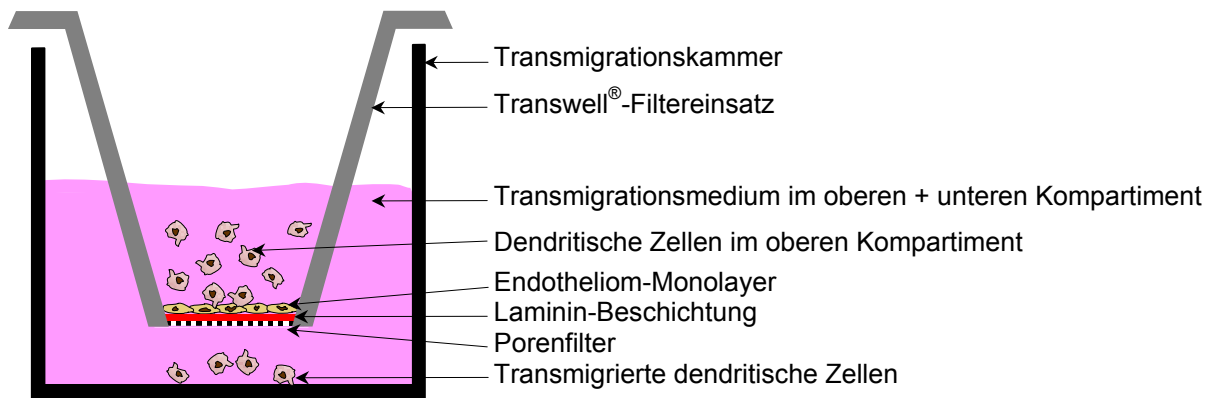
Die Versuchsplatte wurde dann zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffs vor Lichteinfall mit Aluminiumfolie umwickelt und für 20 min bei 37°C in einem horizontalen Schüttler bei 60 rpm inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Zellen durch mehrmaliges Waschen mit je 200  $\mu$ l HBSS mit Hilfe einer Multichannel-Pipette vorsichtig aus den Vertiefungen herausgespült. Die verbliebenen dendritischen Zellen wurden mit je 200  $\mu$ l 2%-igem Glutaraldehyd in HBSS auf den Endotheliomen fixiert. Die einzelnen Versuchsansätze wurden im Anschluss daran unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung betrachtet. Im Zentrum der Vertiefungen wurde eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> mit Hilfe einer Digitalkamera fotografiert und am Computer unter Verwendung der Scion Image<sup>®</sup>-Software die Menge der gebundenen Zellen über die von ihnen bedeckte Fläche ermittelt.

**Spezielle Materialien:**

Horizontaler Schüttler	Innova 4300 (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Glutaraldehyd	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Mikroskop	Axiovert 100 (Zeiss, Oberkochen)
Digitalkamera	S/W-CCD-Kamera (AVT-Horn, Aalen)
Computer	Power Macintosh 7100/80 (Apple Computer, Cupertino, CA, USA)
Scion Image <sup>®</sup> -Software	Version 1.5 ( <a href="http://www.nist.gov/lispix/imlab/prelim/dnld.html">http://www.nist.gov/lispix/imlab/prelim/dnld.html</a> )

### 3.6.3 Transmigrationsexperimente

Die Transmigration dendritischer Zellen wurde mit Hilfe eines Transwell®-Filtersystems (Abb. 3.2) untersucht.



**Abb. 3.2 Aufbau der Transmigrationsexperimente.**

Vor der Aussaat der Endothelioma wurden die Filtereinsätze zur Simulation der im physiologischen Auswanderungsgebiet der dendritischen Zellen vorhandenen subendothelialen Basalmembran mit Laminin beschichtet. Dazu wurden, bei Raumtemperatur und unter sterilen Bedingungen, 50 µl einer Laminin-Lösung in PBS (50 µg/ml) für 30 min in die einzelnen Filtereinsätze gegeben, die Lösung anschließend abgesaugt und die Filter für eine Stunde trocknen gelassen. Danach erfolgte die Aussaat der verschiedenen Endothelioma auf die beschichteten Filter unter den gleichen Bedingungen wie sie für die Adhäsionsexperimente in Kap. 3.6.2 beschrieben worden sind.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden unreife und reife dendritische Zellen (Kap. 3.3) untersucht. Die Zellen wurden am Versuchstag aus ihren Kulturgefäßen entnommen, gezählt und in einer Konzentration von genau  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in Transmigrationsmedium (37°C) aufgenommen und bereitgestellt. In gesonderten Versuchsansätzen wurde die Transmigration in Gegenwart des die  $\beta_2$ -Integrine blockierenden Antikörpers GAME-46 untersucht (Kap. 3.1.2), was eine Vorbehandlung der dendritischen Zellen erforderte: Nach dem Zählen wurden zunächst drei Fraktionen zu je  $4 \times 10^6$  Zellen hergestellt. Diese wurden anschließend pelletiert und in je 200 µl Transmigrationsmedium mit oder ohne Antikörperzusatz resuspendiert: Während die erste Fraktion ohne

Antikörperzusatz blieb, wurden zwei der Anteile für 20 Minuten bei 37°C mit Fc-Rezeptor-Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen der funktionellen Antikörper an die Fc-Rezeptoren und die damit einhergehende Verklumpung der Zellsuspension zu verhindern. Danach wurde einem der beiden Ansätze für weitere 20 Minuten der blockierende CD18-Antikörper GAME-46 (40µg/ml) zugesetzt, während dem zweiten Ansatz ein Kontrollantikörper in gleicher Konzentration zugegeben wurde. Dabei handelte es sich um den gegen PSGL-1 gerichteten Antikörper 4RB12, der in vorangehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Pendl *et al.*, 2002) die Migration der dendritischen Zellen nicht beeinträchtigte.

Unmittelbar vor der Zugabe der dendritischen Zellen wurde das Kulturmedium in den Filtereinsätzen durch 50 µl Transmigrationsmedium (37°C) ersetzt und je 600 µl Transmigrationsmedium in die freien Transmigrationskammern der Versuchsplatte pipettiert. Dann wurden je 50 µl der sorgfältig durchmischten Zellsuspension der dendritischen Zellen (entsprechend  $1 \times 10^6$  Zellen) in die vorbereiteten Filtereinsätze gegeben, welche daraufhin in die mit Transmigrationsmedium gefüllten Vertiefungen der Versuchsplatte überführt wurden. Dann erfolgte die Inkubation für drei Stunden im Brutschrank (37°C, 95% Luftfeuchte, 10% CO<sub>2</sub>). Nach der Inkubationszeit wurden die Filtereinsätze aus den Transmigrationskammern entnommen und in die leeren Vertiefungen der Platte zurückgesetzt. Zur Kontrolle der Integrität des Endothelzell-Monolayers wurden die Filter nach Ende des Experimentes mit Filipin angefärbt, auf einen Objektträger überführt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt (Kap. 3.2.5.2). Die Zahl der transmigrierten dendritischen Zellen wurde mit Hilfe eines Zählautomaten ermittelt. Dazu wurden nach sorgfältiger Durchmischung des Transmigrationsmediums je 500 µl Zellsuspension aus den Transmigrationskammern entnommen und in 9,5 ml Zählpuffer enthaltende Messröhrchen gegeben. Die Überführung und Auszählung erfolgte unmittelbar nach Ende der Inkubationszeit. Mit Hilfe des Zählautomaten konnte auch die Größe der dendritischen Zellen bestimmt werden (Kap. 4.1.1).

**Spezielle Materialien:**

Transwell®-Filtereinsätze	Polycarbonatmembran, 5 µm Poren (Costar, Bodenheim)
Laminin	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Transmigrationsmedium	DMEM, 10% FCS, 1% Gln
Zählautomat	Casy®1 (Schärfe System, Reutlingen)
Messröhrchen	Casy®-Messröhrchen (Schärfe System, Reutlingen)
Zählpuffer	Casy®ton (Schärfe System, Reutlingen)
Fc-Rezeptor-Antikörper	anti-CD16/CD32, clone 2.4G2 (20 µg/ml TMA, Kap. 3.1.3)

**3.7 Statistik**

In den graphischen Darstellungen der vorliegenden Arbeit werden die Mittelwerte der Experimente und ihre Standardabweichung wiedergegeben. Die statistische Signifikanz der Unterschiedlichkeit der Mittelwerte wurde mit Hilfe des Student's-T-Test ermittelt. Das Maß der statistischen Signifikanz wird durch den Faktor  $p$  angegeben. Alle Ergebnisse mit  $p < 0,05$  werden als statistisch signifikant eingestuft.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phänotypisierung der verwendeten Zellen

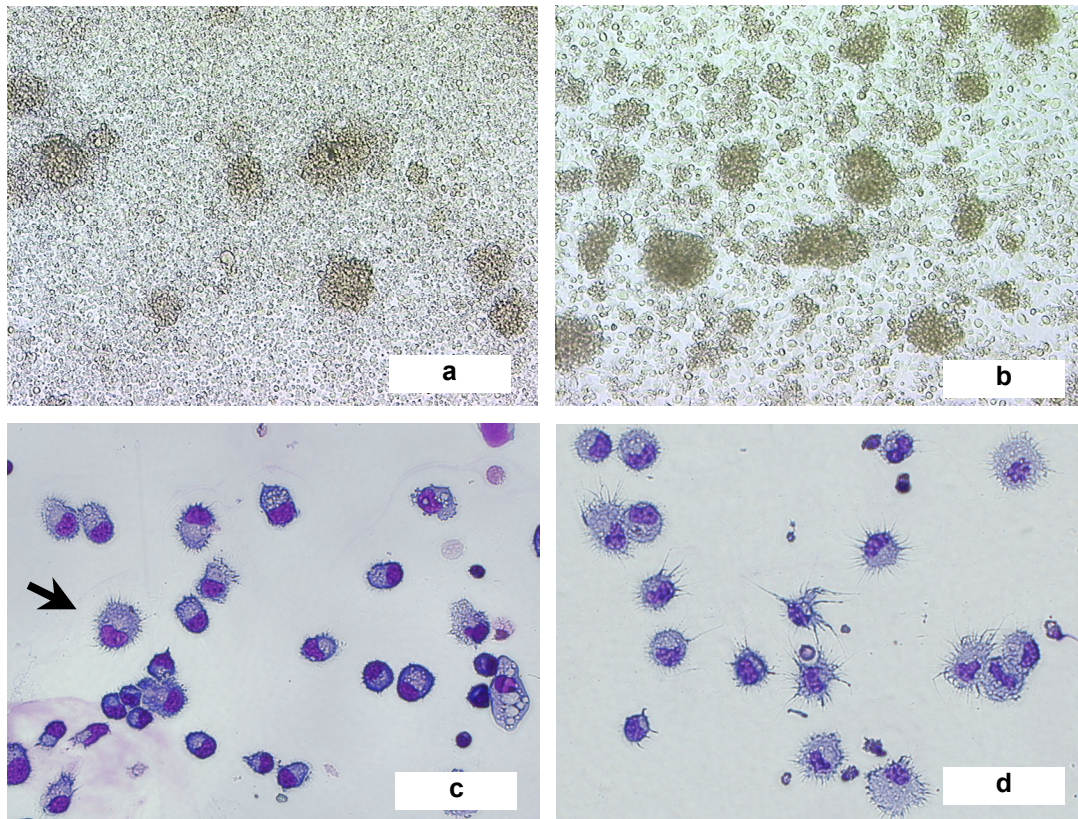
In dieser Arbeit wurden aus murinem Knochenmark differenzierte dendritische Zellen für funktionelle Studien ihres Adhäsions- und Transmigrationsverhaltens in Verbindung mit murinen Endothelzelllinien eingesetzt. In den folgenden beiden Kapiteln soll eine phänotypische Charakterisierung dieser beiden Zelltypen dargestellt werden.

#### 4.1.1 Phänotypisierung der dendritischen Zellen

Zur Gewinnung von unreifen und reifen dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark wurden frisch präparierte Knochenmarkzellen in GM-CSF- und IL-4-konditioniertem RPMI Medium aufgenommen und kultiviert (Kap. 3.3). Um sicher zu stellen, dass die verwendeten Kulturbedingungen zur Differenzierung der Knochenmarkzellen zu dendritischen Zellen führten, wurde die Zellpopulation im Hinblick auf Morphologie und Expression bestimmter Oberflächenantigene über die gesamte Dauer der Kultur beobachtet. In späteren Experimenten wurden die Zellen entweder an Tag 5 oder an Tag 9 bzw. 10 der Kultur verwendet. Während dieser Ausreifungsphase nahm die Zellzahl der Kultur weder drastisch zu noch ab, sondern verringerte sich um ca. 10 % (vgl. Kap. 4.3.2). In den folgenden Abschnitten soll das morphologische Bild und die immunzytometrische Phänotypisierung der Kultur zu den beiden genannten Zeitpunkten beschrieben werden.

#### Morphologie

Am Tag 5 fand sich bei Betrachtung der nativen Kultur durch ein Lichtmikroskop erwartungsgemäß ein heterogenes Bild (Pendl *et al.*, 2002). Es waren sowohl adhärente wie nicht-adhärente Zellen vorhanden, wobei die nicht-adhären Zellen häufig zu Zellhaufen zusammengeschlossen waren (Abb. 4.1a). Die Population setzte sich aus Zellen verschiedener Größe zusammen, von denen einige bereits Dendriten ausgebildet hatten (Abb. 4.1c, Pfeil).



**Abb. 4.1 Morphologischer Vergleich der Kultur dendritischer Zellen an Tag 5 und Tag 9.** Gezeigt sind Übersichtsaufnahmen (50-fache Vergrößerung) der nativen Kulturen in den Kulturgefäßen an Tag 5 (a) und an Tag 9 (b). Außerdem sind Detailaufnahmen (670-fache Vergrößerung) der unreifen (c) und der reifen (d) dendritischen Zellen nach Diff-Quik®-Anfärbung der Zellkerne (Kap. 3.2.4) dargestellt.

Am Tag 9, nach 48-stündiger Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS), zeigte die Kultur deutliche Veränderungen. Fast alle nicht-adhären Zellen hatten Dendriten ausgebildet und waren mit durchschnittlich 950 fl Volumen erheblich größer als die 475 fl messenden Zellen an Tag 5 (Bestimmung mit Hilfe des Casy®-Zählautomaten, vgl. Kap. 3.6.3). Nach Ausreifung der Kultur lag demnach morphologisch eine nahezu homogene Kultur reifer dendritischer Zellen vor (Abb. 4.1d) (Lutz *et al.*, 1999). Auch zu diesem späten Zeitpunkt der Kultur waren Zellhaufen zu erkennen, deren Größe stark variierte (Abb. 4.1b). Die Zellen sollten in späteren funktionellen Tests jedoch als Einzelzellsuspensionen eingesetzt werden, um eine bessere Quantifizierung zu ermöglichen. Deshalb wurde zunächst in Vereinzelungsexperimenten abgeschätzt, wie stark die Bindungskräfte innerhalb der Zellansammlungen waren. Es konnte gezeigt werden, dass weder an Tag 5 noch an Tag 9 hohe Bindungskräfte

vorlagen, da sich die Zellhaufen bereits durch vorsichtiges Auf- und Abpipetieren vereinzeln ließen. Die Voraussetzung für die Quantifizierbarkeit der in den späteren Tests eingesetzten dendritischen Zellen war damit gegeben.

Wie von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Fields *et al.*, 1998; Masurier *et al.*, 1999), lassen sich reife dendritische Zellen neben der charakteristischen Morphologie auch anhand ihres speziellen Expressionsmusters für bestimmte Oberflächenmoleküle erkennen. Diese umfassen die Integrin-alpha-Kette CD11c, die Major-Histocompatibility-Complex-Moleküle der Klasse II (MHC-II), die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), das Antigen internalisierende Glykoprotein DEC-205 (Inaba *et al.*, 1995), das Inter-Cellular-Adhesion-Molecule-1 (ICAM-1) sowie den CD40L-Rezeptor CD40. Während unreife dendritische Zellen für die genannten Moleküle schwach positiv sind, liegen sie bei reifen dendritischen Zellen in höherer Expressionsdichte vor (Pendl *et al.*, 2002).

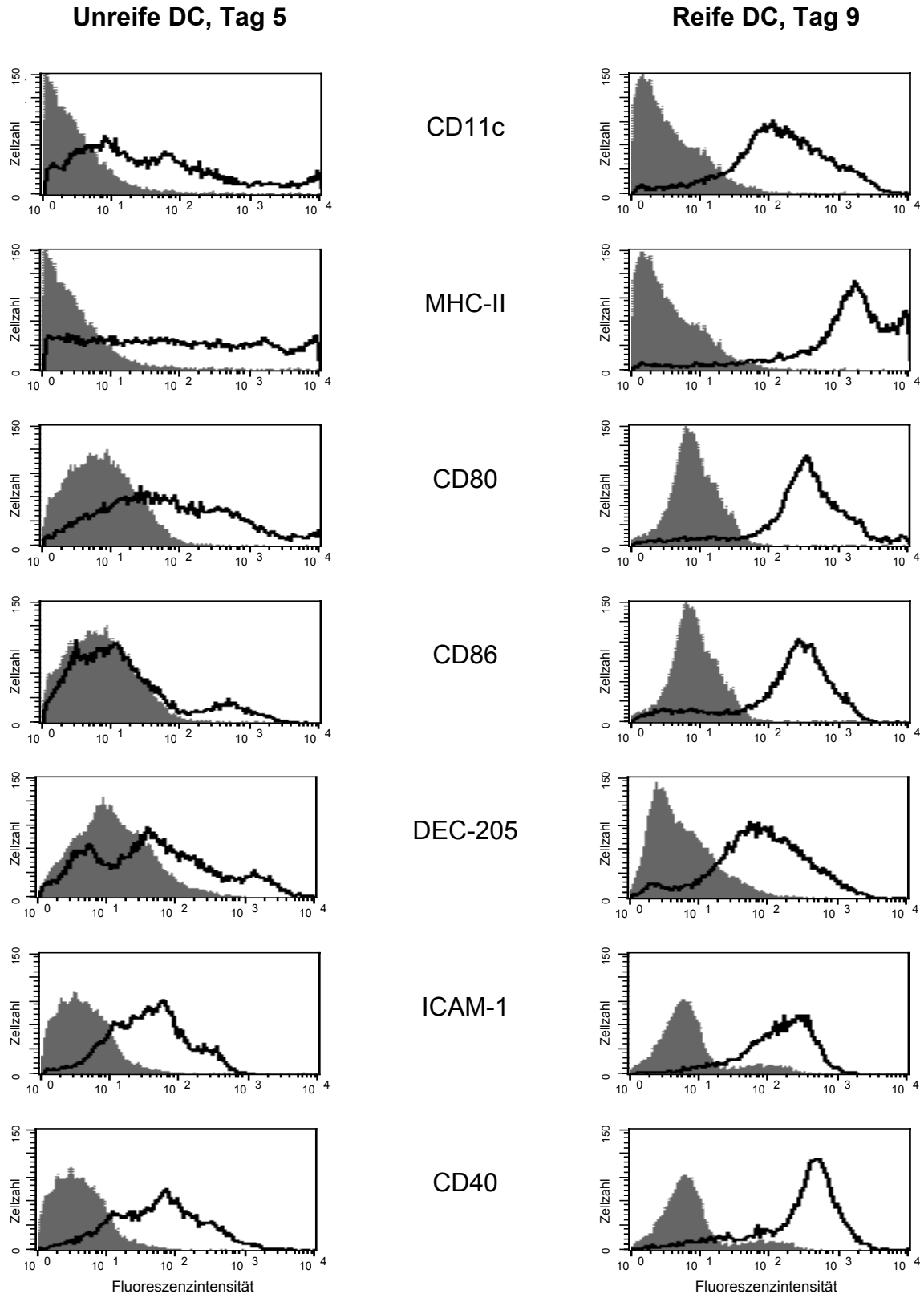
### FACS-Analyse

Die Kultur unreifer und reifer Zellen wurde jeweils, wie in Kap. 3.5.1 beschrieben, für die FACS-Analyse gefärbt und die Höhe der Fluoreszenzintensität der einzelnen Marker untereinander verglichen (Abb. 4.2). Die Moleküle ICAM-1 und CD40 wurden zu diesem frühen Zeitpunkt der Kultur von den meisten Zellen schwach exprimiert. Beim Nachweis von CD11c, MHC-II-Molekülen, CD80, CD86 sowie DEC-205 konnten Zellen verschiedener Expressionshöhe detektiert werden, was vermutlich auf ihren unterschiedlichen Differenzierungsgrad bei der Entwicklung zu reifen dendritischen Zellen zurückzuführen ist. Färbungen für die B- und T-Lymphozytenmarker CD19 bzw. CD3 sowie für NK1.1, einem Marker für natürliche Killerzellen, blieben ab Tag 5 der Kultur durchgehend negativ (keine Abbildung), so dass eine bedeutende Verunreinigung der Kultur mit einem der genannten Zelltypen ausgeschlossen werden konnte. Zur Expression des Monozytenmarkers CD14 und des Markers für myeloide Zellen Gr-1 wird auf Kap. 4.3.2 verwiesen. Die Kultur entsprach damit an Tag 5 weitgehend dem von anderen Arbeitsgruppen gefundenen Bild einer Kultur unreifer dendritischer Zellen (Fields *et al.*, 1998; Labeur *et al.*, 1999). Zellen dieses Kulturalters wurden fortan als unreife dendritische Zellen bezeichnet.

Am Tag 9, nach 48 stündiger Behandlung der Kultur mit Lipopolysaccharid (LPS), war das immunzytometrische Bild deutlich homogener (Abb. 4.2). Fast alle Zellen exprimierten vergleichbare, hohe Level der Marker CD11c, MHC-II, CD80, CD86, DEC-205, ICAM-1 und CD40 und entsprachen, in Übereinstimmung mit dem lichtmikroskopischen Bild (Abb. 4.1d) und der oben bereits zitierten Literatur, dem typischen Phänotyp reifer dendritischer Zellen.

Die verwendeten Kulturbedingungen erwiesen sich somit geeignet, eine unreife dendritische Zellpopulation ohne bedeutende Kontamination mit anderen Zelltypen aus murinem Knochenmark zu generieren und diese im weiteren Verlauf der Kultur zu reifen dendritischen Zellen zu differenzieren.





**Abb. 4.2 Immunzytometrischer Vergleich der unreifen und reifen dendritischen Zellen.** Die Färbungen für die verschiedenen Oberflächenmoleküle sind durch die fett gedruckte schwarze Linie und die Hintergrundbindung der Isotyp-Kontrollen als graue Fläche dargestellt. Gezeigt werden Daten aus zwei repräsentativen von insgesamt fünf Experimenten.

### 4.1.2 Phänotypisierung der immortalisierten Endothel-Zelllinien

Zur Untersuchung des endothelialen Adhäsions- und Transmigrationsverhaltens dendritischer Zellen standen drei immortalisierte murine Gehirn-Endothel-Zelllinien (brain-Endotheliom, bEnd) zur Verfügung (Kap. 3.1.2).

Zelllinie	Eigenschaften	Bezeichnung innerhalb dieser Arbeit	Referenz
<b>bEnd5</b>	Wildtyp-Endotheliom	WT.bEnd	(Bussolino <i>et al.</i> , 1991; Wagner & Risau, 1994)
<b>bEndI1/2.1 RL</b>	ICAM-1/ICAM-2-defizientes Endotheliom	I1-/I2-.bEnd	(Lyck <i>et al.</i> , 2003)
<b>bEndI1/2.1-I2 B1</b>	ICAM-2 retransfiziert in ICAM-1/ICAM-2-defizientes Endotheliom	I1-/I2+.bEnd	(Lyck <i>et al.</i> , 2003)

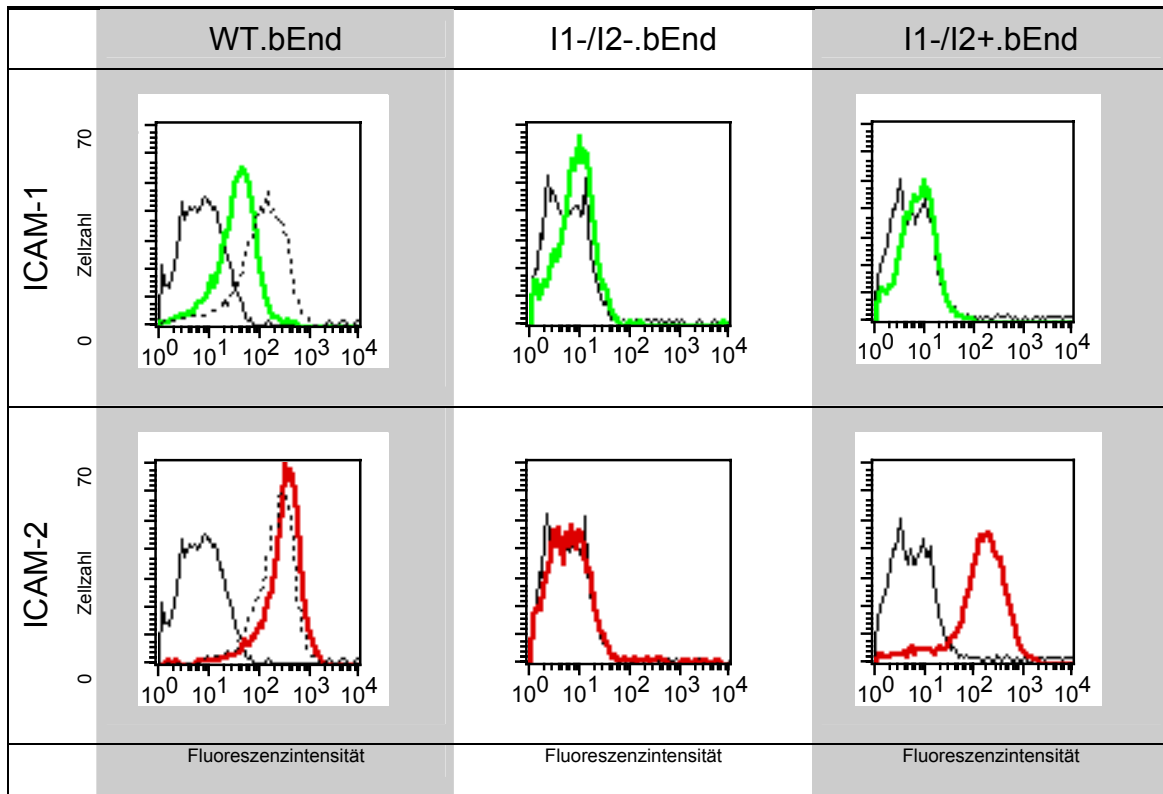
**Tab. 4.1 Überblick über die verwendeten Endothel-Zelllinien.**

Die Zelllinien wurden mittels zwei verschiedener Untersuchungsmethoden auf die für sie beschriebenen Unterschiede der Expression von ICAM-1 und ICAM-2 getestet.

#### 4.1.2.1 FACS-Analyse der Endothel-Zelllinien

Die Endotheliome wurden 48 h nach ihrer Aussaat in 6-Lochplatten (zu diesem Zeitpunkt fanden auch die funktionellen Experimente statt) mit Hilfe von EDTA/Trypsin-Lösung vom Boden der Kulturgefäße abgelöst und anschließend wie unter 3.5.1 beschrieben für die FACS-Analyse gefärbt.

Wie erwartet, zeigte das Wildtyp-Endotheliom (WT.bEnd) deutlich positive Signale für ICAM-1 und ICAM-2, während das für ICAM-1 und ICAM-2 doppeldefiziente Endotheliom (I1-/I2-.bEnd) beide Moleküle nicht exprimierte. Das doppeldefiziente Endotheliom, das für ICAM-2 retransfiziert worden war (I1-/I2+.bEnd), zeigte kein Signal für ICAM-1, war jedoch deutlich positiv für ICAM-2-Expression (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3 FACS-Analyse der ICAM-1- und ICAM-2-Expression der Endothel-Zelllinien.** Die Färbungen für ICAM-1 (Antikörper YN1.1) sind in grün dargestellt, die für ICAM-2 (Antikörper 3C4) in rot, die der Isotyp-Kontrolle (Ratten-IgG) in schwarz. Die gestrichelte Linie beim Wildtyp-Endothelium (WT.bEnd) gibt das Ergebnis der Anfärbung nach 20-stündiger TNF- $\alpha$ -Stimulation (5nM) wieder. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Beim Vergleich der Werte für Wildtyp- bzw. ICAM-2-retransfiziertes Endothelium wurden Unterschiede in Bezug auf die Expressionslevel für ICAM-2 beobachtet. Auf dem retransfizierten Endothelium fand sich eine etwas schwächere ICAM-2-Expression als auf dem Wildtyp-Endothelium. Bei drei unabhängigen Experimenten reichte die durchschnittliche ICAM-2-Expression auf Retransfektanten von 53% bis 85% der Expressionslevel auf Wildtyp-Endothelium.

Zusätzlich wurde das Expressionsmuster von ICAM-1 und ICAM-2 nach Stimulierung der WT.bEnd durch 20-stündige Zugabe von Tumor-Necrosis-Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 5nM) untersucht. In einem repräsentativen von insgesamt drei Experimenten (Abb. 4.3) war die Expression von ICAM-1 auf unstimulierten WT.bEnd-Zellen schwächer als die für ICAM-2 (gemessen als 'mean fluorescence intensity' = mfi, ICAM-1: 40, ICAM-2: 306). Nach TNF- $\alpha$ -Inkubation stieg die ICAM-1-Expression deutlich an (mfi:149) während ICAM-2

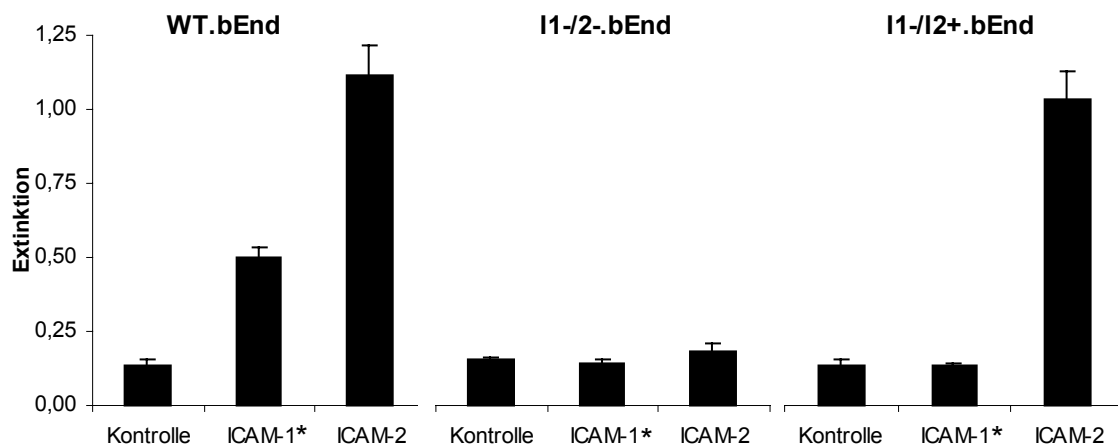
schwächer exprimiert wurde als zuvor (mfi: 244). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisher im humanen System gemachten Beobachtungen zur ICAM-1- bzw. ICAM-2-Expression von Endothelzellen (McLaughlin *et al.*, 1998), wonach ICAM-1 nach Zytokin-induzierter Aktivierung verstärkt an der Endothelzelloberfläche exprimiert wird, ICAM-2 jedoch vermindert.

Zusammengenommen entsprachen die Beobachtungen somit dem erwarteten Muster der unterschiedlichen Expression von ICAM-1 und ICAM-2 auf den drei Endothel-Zelllinien. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das typische endotheliale Reaktionsmuster auf Stimulation mit TNF- $\alpha$  bei den verwendeten Zelllinien erhalten war. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur Kontrolle der Expressionshöhe von ICAM-2 auf den retransfizierten Zellen wurden die Endotheliome in der Kulturschale mit Hilfe des cell-surface-ELISA überprüft.

#### 4.1.2.2 Cell-surface-ELISA der Endothel-Zelllinien

Zur Verifizierung der FACS-Analyse (Kap. 4.1.2.1) wurden cell-surface-ELISA mit den verschiedenen Endotheliomen durchgeführt. Hierzu wurden diese, wie unter Kap. 3.5.2 beschrieben, in 96-Lochplatten ausgesät und nach 48 Stunden auf ihre ICAM-1- bzw. ICAM-2-Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Adhäsionsmoleküle auch auf den konfluenten Zellrasen innerhalb der Kulturschale nachweisen ließen. Es wurde bestätigt, dass das Wildtyp-Endothelium sowohl ICAM-1 als auch ICAM-2 auf der Zelloberfläche exprimiert. Dagegen waren beide Moleküle auf ICAM-1- und ICAM-2-defizientem Endothelium nicht zu detektieren, während die für ICAM-2 retransfizierten, ursprünglich doppeldefizienten Zellen negativ für ICAM-1, aber wieder positiv für ICAM-2 waren.

Alle Messungen für ICAM-1 wurden nach 20-stündiger TNF- $\alpha$ -Behandlung (5 nM) durchgeführt, um durch die Hochregulation der ICAM-1-Expression sichere Unterscheidung von ICAM-1-positiven und ICAM-1-negativen Zellen zu ermöglichen. Ein repräsentatives Experiment ist in Abb. 4.4 dargestellt.



**Abb. 4.4 Cell surface ELISA zur ICAM-1- und ICAM-2-Expression der Endotheliome.** Für die Expression von ICAM-2 auf WT.bEnd und I1-/I2+.bEnd kann kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p > 0,05$ ). Dargestellt ist die mittlere Extinktion und die Standardabweichung der gemessenen Triplikate eines repräsentativen Experiments ( $n=3$ ). Zum Nachweis von ICAM-1 wurde der aufgereinigte monoklonale Antikörper YN1.1 eingesetzt, für ICAM-2 der Antikörper 3C4, als Isotyp-Kontrolle diente Ratten-IgG.

\*Alle Bestimmungen für ICAM-1 wurden nach 20-stündiger Behandlung mit 5 nM TNF- $\alpha$  vorgenommen, um eine theoretisch mögliche ICAM-1-Expression detektieren zu können.

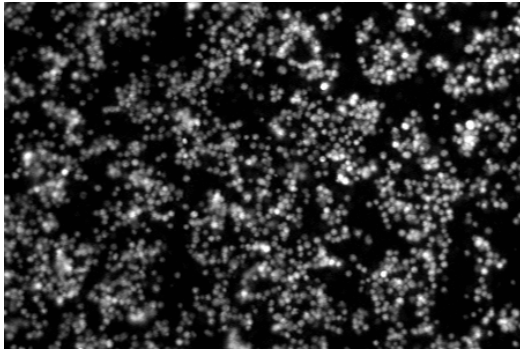
In drei unabhängigen Experimenten wurde, wie schon bei der FACS-Analyse, die Höhe der ICAM-2-Expression auf ICAM-2-retransfiziertem Endothelium mit der auf Wildtyp-Endothelium verglichen. Danach fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expressionshöhe für ICAM-2, denn die durchschnittliche Extinktion bei ICAM-2-retransfiziertem Endothelium erreichte  $95,6 \pm 9,7\%$  der mit dem Wildtyp-Endothelium gemessenen Werte. Die in der FACS-Analyse bestimmte, etwas geringere ICAM-2-Expression der retransfizierten Zellen gegenüber dem Wildtyp, konnte hier also nicht verifiziert werden. Mögliche Gründe hierfür werden in Kap. 5.3 diskutiert.

Zusammengenommen zeigen die FACS-Analyse und die im Cell-Surface-ELISA ermittelten Daten das erwartete Ergebnismuster der ICAM-1- und ICAM-2-Expression auf den drei Endothelium-Zelllinien. Sie waren somit zur Untersuchung ICAM-2-abhängiger Interaktionen zwischen dendritischen und endothelialen Zellen geeignet. Es ist für die weiter unten vorgestellten Ergebnisse jedoch zu beachten, dass hier nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Expressionsdichte von ICAM-2 auf retransfiziertem Endothelium der des Wildtyp-Endotheliums entsprach oder geringer war. Falls die ICAM-2 Expression auf retransfiziertem Endothelium durchgängig geringer war als die auf Wildtyp Endothelium (vgl. FACS-Daten), sind die im folgenden dargestellten ICAM-2-abhängigen Effekte tatsächlich möglicherweise höher als in dieser Arbeit angegeben. Alle Angaben über die Rolle von ICAM-2 bei den gezeigten zellulären Interaktionen sind unter diesem Gesichtspunkt zu beurteilen.

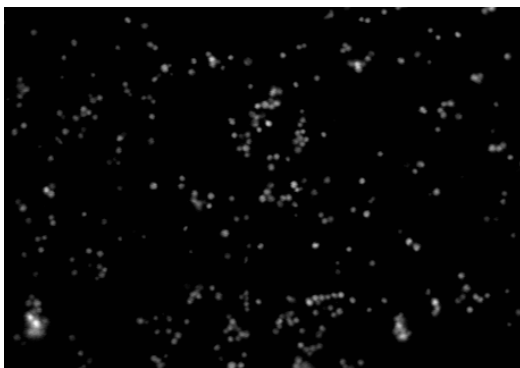
## 4.2 Adhäsion unreifer dendritischer Zellen

### 4.2.1 Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an Endotheliom-Zellen

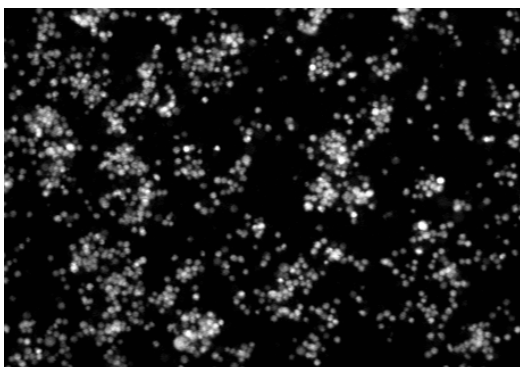
WT.bEnd



I1-/I2-.bEnd



I1-/I2+.bEnd



**Abb. 4.5** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an den Endotheliomen.

Die feste Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel ist nach dem anerkannten Modell der Multistep-Adhäsionskaskade Voraussetzung für die anschließende Transmigration der Leukozyten durch die Gefäßwand (Kap. 2.2.1).

Im folgenden Abschnitt sollen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Bedeutung von ICAM-2 für die feste Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an ruhendem (d.h. nicht durch Zytokine aktiviertem) Endotheliom dargestellt werden.

Hierzu wurden die drei in Kap. 4.1.2 beschriebenen Endothelioma verwendet. 48 Stunden vor Beginn eines Adhäsionsexperimentes wurden die Endotheliom-Zellen in jeweils drei Vertiefungen von 96-Lochplatten ausgesät. Nachdem die Endothelzellrasen vor Beginn des Experiments unter dem Lichtmikroskop auf ihre Konfluenz überprüft worden waren (Daten nicht gezeigt), wurden unreife, mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbte dendritische Zellen zugegeben, und 20 Minuten bei 37°C und 60 rpm inkubiert.

Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen ab gespült und die verbleibende Menge fest adhärenenten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops ausgewertet (Kap. 3.6.2).

Abb. 4.5 gibt das optische Bild eines repräsentativen Experiments wieder, wie es sich unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellte. Die starke Adhäsion unreifer dendritischer Zellen am Wildtyp-Endothelium war am ICAM-1/ICAM-2-doppeldefizienten Endothelium stets stark reduziert, während am ICAM-2 retransfizierten Endothelium wieder vermehrte Adhäsion zu beobachten war.

Mit Hilfe der Scion Image Software (Kap. 3.6.2), konnte die Adhäsionsfähigkeit der dendritischen Zellen an den verschiedenen Endotheliomen quantifiziert werden. Zur besseren Übersicht wurde die am Wildtyp-Endothelium beobachtete Adhäsion gleich 100% gesetzt und die Ergebnisse der beiden anderen Endotheliome damit verglichen. Die so erhaltene 'standardisierte Adhäsion' ließ auch einen Vergleich zwischen den einzelnen Experimenten zu. Einen Überblick über die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten zeigt Tab. 4.2.

Experiment	WT.bEnd	I1-/I2-bEnd	I1-/I2+.bEnd	Faktor
1	100 ± 11,7 %	29,8 ± 11,6 %	83,4 ± 12,4 %	2,8
2	100 ± 59,2 %	5,3 ± 2,2 %	48,9 ± 2,1 %	9,3
3	100 ± 16,3 %	14,7 ± 16,2 %	38,5 ± 3,1 %	2,6
4	100 ± 17,5 %	6,4 ± 1,3 %	96,8 ± 15,0 %	15,0
5	100 ± 29,1 %	11,2 ± 6,9 %	112,7 ± 28,9 %	10,1

**Tab. 4.2 Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an den Endotheliomen.**

Die unreifen dendritischen Zellen wurden 20 min bei 37°C und 60 rpm mit den Endotheliomen inkubiert. Aufgeführt ist jeweils die standardisierte Adhäsion als Mittelwert der Triplikatbestimmungen der einzelnen Experimente in Prozent ± Standardabweichung. Der Faktor in der rechten Spalte gibt die Steigerung der Adhäsion unreifer dendritischer Zellen am ICAM-2-retransfizierten Endothelium gegenüber dem doppeldefizientem Endothelium an.

Die Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an doppeldefizientem Endothelium war in allen Experimenten deutlich vermindert gegenüber der Adhäsion am Wildtyp-Endothelium. Sie wurde in den fünf unabhängigen Experimenten auf Werte zwischen 5,3% und 29,8% der Adhäsion am Wildtyp-Endothelium reduziert. Weiterhin war in jedem Experiment eine deutliche Steigerung der



Adhäsion an ICAM-2-retransfizierter gegenüber ICAM-1/ICAM-2-doppeldefizientem Endothelium zu beobachten. Dabei handelte es sich um eine Steigerung der Adhäsion dendritischer Zellen um den Faktor 2,6 bis 15,0 (Tab. 4.2). In einigen Experimenten erreichte die an retransfizierter Endothelium beobachtete Adhäsion die gleichen oder sogar geringfügig höhere Werte als die am Wildtyp-Endothelium, in anderen Experimenten wurden nur 38,5% oder 48,9% der Adhäsion am Wildtyp-Endothelium gemessen. Trotz dieser starken Schwankungen war jedoch in jedem Experiment eine eindeutige Zunahme der Adhäsion an ICAM-2-retransfizierter Endothelium gegenüber dem doppeldefizienten Endothelium zu verzeichnen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Adhäsion unreifer dendritischer Zellen am Endothelium unter den gegebenen Bedingungen zu einem großen Teil von endothelialelem ICAM-2 abhängig war. Die oben genannten Steigerungsraten der Adhäsion von 2,6 bis 15,0 zeigen, dass sich die Adhäsionsfähigkeit der dendritischen Zellen bei Anwesenheit von endothelialelem ICAM-2 mehr als verdoppelt. Eine genauere Quantifizierung des ICAM-2-Beitrages ist auf Grund der hohen Schwankungsrate zwischen den verschiedenen Experimenten jedoch nicht möglich.

Weiterhin wurde untersucht, ob ICAM-1 für die Adhäsion unreifer dendritischer Zellen am ruhenden Endothelium eine Rolle spielt. In einigen Experimenten wurde am ICAM-2-retransfizierten Endothelium die gleiche Adhäsionsstärke wie am Wildtyp-Endothelium beobachtet, was implizierte, dass ICAM-1 hier keinerlei Rolle spielte. In anderen Experimenten jedoch erreichte sie nur weniger als 50%, was, im Gegensatz zur vorhergehenden Beobachtung, für einen ICAM-1-Beitrag sprach. Daher muss an dieser Stelle offen bleiben, ob die nur teilweise zu beobachtende Reduktion der Adhäsion an ICAM-2-retransfizierter Endothelium tatsächlich auf das Fehlen von ICAM-1 zurückzuführen ist. Zur Bedeutung von ICAM-1 wurden weitere, im Folgenden Kapitel dargestellte Untersuchungen durchgeführt.

### 4.2.2 Adhäsion unreifer dendritischer Zellen an Fusionsproteinen

Nachdem bei der Adhäsion der unreifen dendritischen Zellen an die Endotheliome eine deutliche ICAM-2-Abhängigkeit gezeigt werden konnte, sollte die weiterhin offene Frage nach der Rolle von ICAM-1 für diese Interaktion mit Hilfe von Adhäsionsexperimenten an immobilisiertem ICAM-1-Fc-Fusionsprotein näher untersucht werden. Dazu standen Fusionsproteine aus murinen Adhäsionsmolekülen und dem Fc-Teil von humanem Immunglobulin G<sub>1</sub> zur Verfügung:

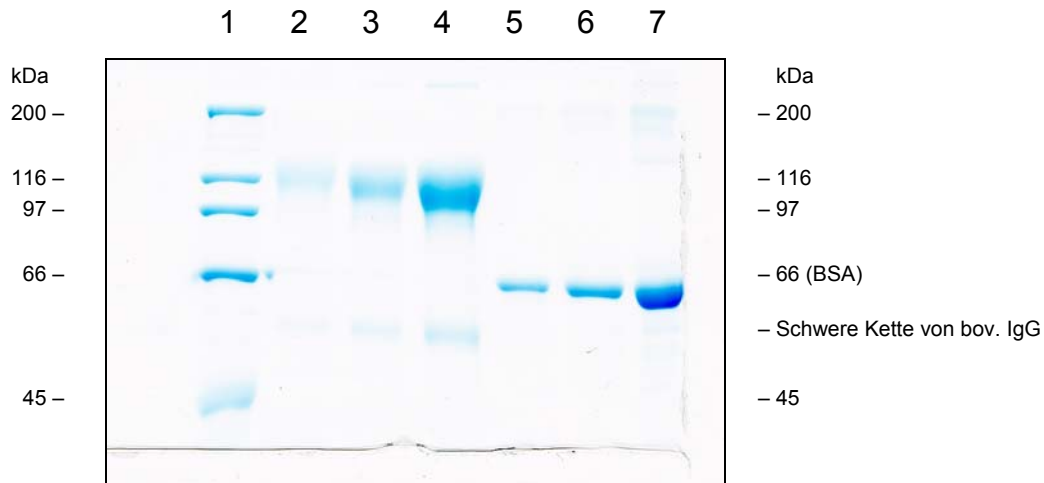
1. P-Selektin-Fc-Fusionsprotein (Hahne *et al.*, 1993)
2. ICAM-1-Fc-Fusionsprotein (AG Vestweber, J. E. Blanks, unveröffentlicht)

Als Kontrollprotein ohne Adhäsionsmolekülkomponente wurde humanes IgG<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Die Verhältnisse für die Bindung an ICAM-2-Fc-Fusionsprotein konnten nicht weiter untersucht werden, da zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit kein funktionelles, murines ICAM-2-Fc-Fusionsprotein zur Verfügung stand.

#### 4.2.2.1 Gewinnung und Aufreinigung von ICAM-1-Fc-Fusionsprotein

Die Aufreinigung von ICAM-1-Fc-Fusionsprotein erfolgte aus Kulturüberstand von stabil transfizierten CHO-Zellen (Kap. 3.1.2). Es wurden 2, 4 und 10 µg des aufgereinigten Proteins (ausgehend von der über die optische Dichte ermittelten Konzentration von 0,74 µg/µl) in einem 8%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Abb. 4.6, Spur 2-4). Mit Hilfe des Markers (Spur 1) konnte das Molekulargewicht des ICAM-1-Fc-Fusionsproteins überprüft werden. Dieses beträgt wie erwartet 115 kDa. Zur genaueren Konzentrationsbestimmung des Fusionsproteins wurden die gleichen Mengen BSA aufgetragen und die Bandenintensität verglichen (Abb. 4.6, Spur 5-7). Unter Berücksichtigung einer geringen Verunreinigung durch die schwere Kette des bovinen Immunglobulins aus dem FCS des Kulturmediums (Bande bei 50 kDa) wurde die Konzentration des ICAM-1-Fc-Fusionsproteins auf 0,65 µg/µl festgelegt.

Damit konnte das ICAM-1-Fc-Fusionsprotein in der für die weiteren Experimente erforderlichen Reinheit und Konzentration aufgereinigt werden.



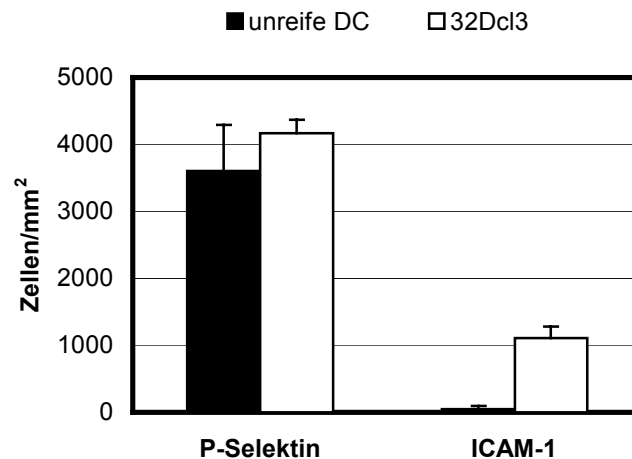
**Abb. 4.6 SDS-PAGE mit ICAM-1-Fc-Fusionsprotein.**

Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spur 2-4: ICAM-1-Fc-Fusionsprotein; Spur 5-7: bovines Serum-Albumin (BSA); kDa = Kilo-Dalton.

#### 4.2.2.2 Adhäsion an ICAM-1-Fc-Fusionsprotein

Für die Adhäsionsexperimente wurde das in Kap. 4.2.2.1 beschriebene ICAM-1-Fc-Fusionsprotein auf 96-Lochplatten immobilisiert (Kap. 3.6.1). Da Pendl et al. bereits gezeigt hatten, dass unreife dendritische Zellen in einem ähnlichen Test an ein P-Selektin-Fc-Fusionsprotein binden konnten, wurde dieses als Positiv-Kontrolle in gleicher Weise eingesetzt. Zur Bestimmung der Höhe der unspezifischen Bindung an den humanen Immunglobulin-Teil der Fusionsproteine diente kommerziell erhältlichliches humanes IgG<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Die Funktionalität des ICAM-1-Fc-Fusionproteins sollte mit Hilfe der myeloiden Mauszelllinie 32Dcl3 überprüft werden, deren Bindungsfähigkeit an ein solches Fusionsprotein ebenfalls bereits belegt ist (AG Vestweber, J. E. Blanks, unveröffentlichte Daten).

In Abb. 4.7 ist das Adhäsionsverhalten unreifer dendritischer Zellen und 32Dcl3-Zellen an die beiden Fusionsproteine dargestellt.



**Abb. 4.7 Adhäsion unreifer dendritischer Zellen und 32Dcl3-Zellen an P-Selektin- bzw. ICAM-1-Fc-Fusionsprotein.**

Während sich die Bindung der 32Dcl3-Zellen an P-Selektin und ICAM-1 signifikant von der an IgG<sub>1</sub> unterscheidet ( $p < 0,001$ ), binden unreife dendritische Zellen nur spezifisch an P-Selektin ( $p < 0,001$ ), nicht aber an ICAM-1 ( $p > 0,05$ ). Unreife dendritische Zellen ( $n=3$ ) und 32Dcl3-Zellen ( $n=2$ ) wurden 20 min bei 4°C und 60 rpm auf einem horizontalen Schüttler mit den immobilisierten Fusionsproteinen (Coating mit 20 µg/ml) inkubiert. Dargestellt ist die durchschnittliche Zellzahl der adhären Zellen / mm<sup>2</sup>, abzüglich der an humanem IgG<sub>1</sub> beobachteten, geringen unspezifischen Bindung.

Beide Zellarten zeigten die erwartete starke Bindungsfähigkeit an das P-Selektin-Fc-Fusionsprotein. Eine gegenüber der unspezifischen Bindung an humanes IgG<sub>1</sub> erhöhte Bindungsfähigkeit an das ICAM-1-Fc-Fusionsprotein war nur für die 32Dcl3-Zellen, nicht aber für die unreifen dendritischen Zellen zu beobachten. Diese waren demnach nicht zur Bindung an ICAM-1 fähig, obwohl sie  $\beta_2$ -Integrine als mögliche Bindungspartner für ICAM-1 auf ihrer Oberfläche trugen (Kap. 4.3.4.1, Abb. 4.12), und die Funktionalität des ICAM-1-Fc-Fusionsproteins durch die Kontrollexperimente mit 32Dcl3-Zellen belegt werden konnte (Abb. 4.7).

Diese Ergebnisse lassen in Verbindung mit den Daten der endothelialen Adhäsionsexperimente vermuten, dass ICAM-1 für die feste Adhäsion von unreifen dendritischen Zellen am Endothel keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

### **4.3 Transendotheliale Migration dendritischer Zellen**

In einem der physiologischen Situation nachempfundenen Transmigrationsexperiment (Kap. 3.6.3) sollte die Migration von unreifen dendritischen Zellen durch einen Endothelzellrasen untersucht werden. Hierzu wurden Endothelzellen auf einem mit Laminin überzogenen Polycarbonatfilter ausgesät, der mit Poren von 5 µm Durchmesser durchsetzt war. Wie Färbungen der ausgesäten Endotheliume mit Filipin zeigten, wuchsen die Zellen innerhalb von 48 Stunden zu einem kontinuierlichen, einreihigen Zellrasen zusammen und bildeten so eine lückenlose Barriere zwischen oberem und unterem Kompartiment der Transmigrationskammer. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine zuvor mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmte Zahl dendritischer Zellen in das obere Kompartiment des Transwell®-Filtereinsatzes gegeben, der anschließend in eine mit Transmigrationsmedium gefüllte Vertiefung der Versuchsplatte überführt wurde. Nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 95% Luftfeuchte, 10% CO<sub>2</sub>) wurden die Filter herausgenommen und die Zahl der im unteren Kompartiment befindlichen Zellen mit Hilfe eines Zählautomaten bestimmt.

#### **4.3.1 Migration der dendritischen Zellen durch Wildtyp-Endothelium**

Zunächst musste geklärt werden, ob aus murinem Knochenmark differenzierte dendritische Zellen in einem wie oben beschriebenen Transmigrationstest Endothelium und Filter tatsächlich durchwanderten. Zur Beantwortung dieser Frage wurde Wildtyp-Endothelium (Kap. 3.1.2) als Endothelzellrasen sowie unreife und reife dendritische Zellen (Kap. 3.3) eingesetzt. Die Zahl der nach dem Experiment im unteren Kompartiment enthaltenen Zellen wurde zu der im oberen Kompartiment eingesetzten Zellzahl ins Verhältnis gesetzt und so die Transmigrationsrate, d.h. der Prozentsatz der transmigrierten Zellen, bestimmt. Sechs unabhängige Experimente dieser Art zeigten, dass unreife dendritische Zellen das Endothelium mit Transmigrationsraten von durchschnittlich  $3,07 \pm 0,23\%$  durchwanderten. Die Ergebnisse der Einzelexperimente sind in Tab. 4.3 dargestellt. Bei drei dieser Experimente wurden neben unreifen auch reife dendritische Zellen eingesetzt. Für diese ergaben sich durchschnittlich

deutlich geringere Transmigrationsraten von nur  $0,029 \pm 0,046\%$  der eingesetzten Zellen. In einigen Einzelmessungen wurden überhaupt keine transmigrierten Zellen im unteren Kompartiment detektiert. Die Ergebnisse der drei vergleichenden Experimente sind in Tab. 4.3 zusammengefasst:

Experiment	Unreife DC	Reife DC
1	<b>2,93</b> $\pm$ 0,25 %	<b>0,082</b> $\pm$ 0,028 %
2	<b>3,04</b> $\pm$ 0,25 %	<b>0,002</b> $\pm$ 0,003 %
3	<b>2,71</b> $\pm$ 0,08 %	<b>0,002</b> $\pm$ 0,003 %
4	<b>3,30</b> $\pm$ 0,26 %	
5	<b>3,21</b> $\pm$ 0,18 %	
6	<b>3,26</b> $\pm$ 0,19 %	
Durchschnitt	<b>3,07</b> $\pm$ 0,23 %	<b>0,029</b> $\pm$ 0,046 %

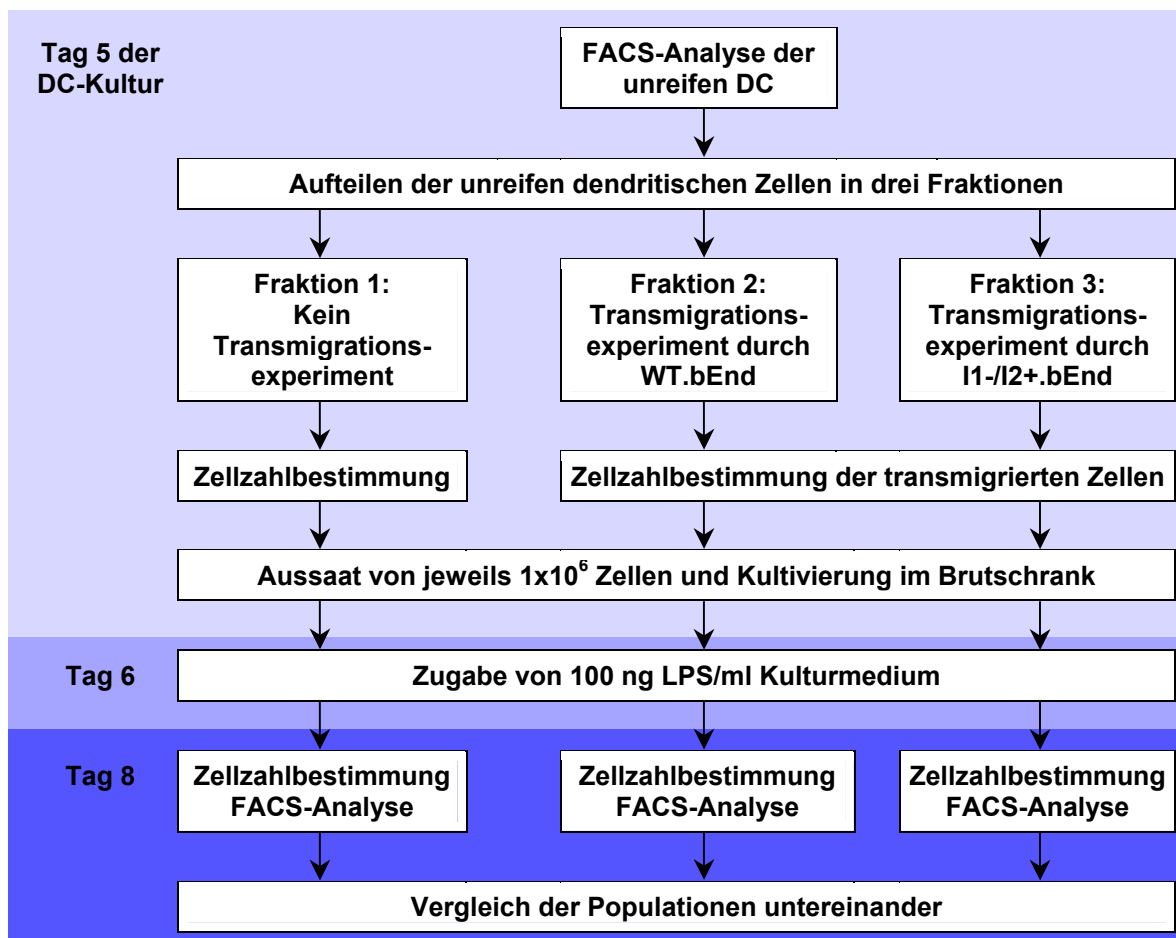
**Tab. 4.3 Transmigrationsraten unreifer und reifer dendritischer Zellen durch Wildtyp-Endothelium.** Angegeben ist die durchschnittliche Transmigrationsrate  $\pm$  Standardabweichung in Prozent, sowie der Durchschnitt aller Experimente  $\pm$  Standardabweichung.

### 4.3.2 Charakterisierung der transmigrierenden Zellpopulation

Wie in Kap. 4.1.1 beschrieben war die Population der dendritischen Zellen an Tag 5 morphologisch und immunzytometrisch noch relativ heterogen. Obwohl die Kultur sicher keine Lymphozyten enthielt (vgl. Kap. 4.1.1) bestand theoretisch die Möglichkeit, dass der mit durchschnittlich ca. 3% relativ geringe Anteil der migrierenden Zellen möglicherweise keine unreifen dendritischen Zellen, sondern eine andere, die Kultur kontaminierende Zellpopulation aus z.B. Granulozyten oder Monozyten sein könnte.

Zur Klärung dieser Frage, wurden die dendritischen Zellen vor und nach erfolgter Transmigration mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Bei Färbungen der Populationen für CD11c, CD14 und CD80 direkt nach der Transmigration durch die Endothelome konnte keine deutliche Veränderung der transmigrierten Zellpopulation im Vergleich zur Ausgangs-Zellpopulation detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Lediglich das kostimulatorische Molekül CD80 wurde in der transmigrierten Population geringfügig stärker exprimiert. Um die transmigrierten Zellen eindeutig als unreife dendritische Zellen zu

identifizieren, wurde im Anschluss die Ausreifung transendothelial migrierter Zellen mit der Ausreifung nicht transmigrierter Zellen verglichen. Wenn die Populationen - transmigriert oder nicht transmigriert - nach einer bestimmten zusätzlichen Ausreifungszeit die gleiche Zellzahl und den gleichen immunzytometrischen Phänotyp aufwiesen, mussten am Tag 5 unreife dendritische Zellen transmigriert sein. Zur besseren Übersicht ist der Versuchsablauf in Abb. 4.8 schematisch dargestellt.

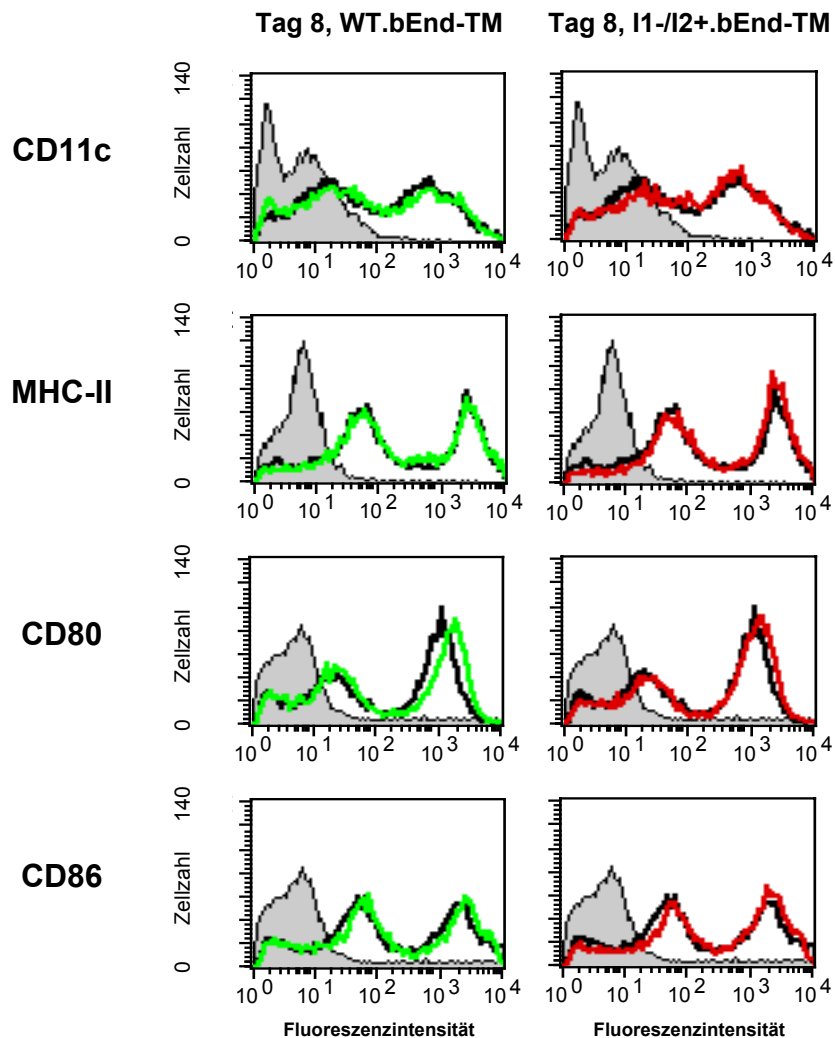


**Abb. 4.8** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Charakterisierung der transmigrierten Zellen.

Es wurden also drei Bedingungen untereinander verglichen:

1. Zellen an Tag 8 der Kultur, die nicht transmigriert waren
2. Zellen an Tag 8 der Kultur, die durch WT.bEnd transmigriert waren
3. Zellen an Tag 8 der Kultur, die durch I1-/I2+.bEnd transmigriert waren  
(Die bei Transmigration durch I1-/I2-.bEnd erhaltenen Zellzahlen waren für eine Weiterkultivierung zu gering.)

Durch die FACS-Analyse am Tag 5 wurde die Expression der Marker CD11c, MHC-II-Moleküle, CD80 und CD86 für die Ausgangspopulation aller drei Ansätze festgehalten (vgl. Abb. 4.2). Nach erfolgter Transmigration wurden die Zellen gezählt und wie die nicht transmigrierte Fraktion zu  $1 \times 10^6$  Zellen in 5 ml IL-4- und GM-CSF-konditioniertem Kulturmedium weiter zur Ausreifung gebracht. Nach 24 Stunden (Tag 6) wurde den drei Kulturen für die letzten 48 Stunden LPS (100 ng/ml Medium) zugesetzt, um ihre Ausreifung zu forcieren. Am Tag 8 der Kultur wurden die Zellen geerntet und die zurückgewonnenen Zellzahlen sowie der Reifegrad der verschiedenen Populationen mittels einer erneuten FACS-Analyse untereinander verglichen.



**Abb. 4.9 FACS-Analyse der Kulturen dendritischer Zellen an Tag 8 ohne Transmigration und nach Transmigration (TM) durch WT.bEnd bzw. I1-/I2+.bEnd.** Die nicht transmigrierte Population ist in schwarz, die durch WT.bEnd transmigrierte in grün, die durch I1-/I2+.bEnd transmigrierte in rot und die Isotyp-Kontrollmessung als graue Fläche wiedergegeben.



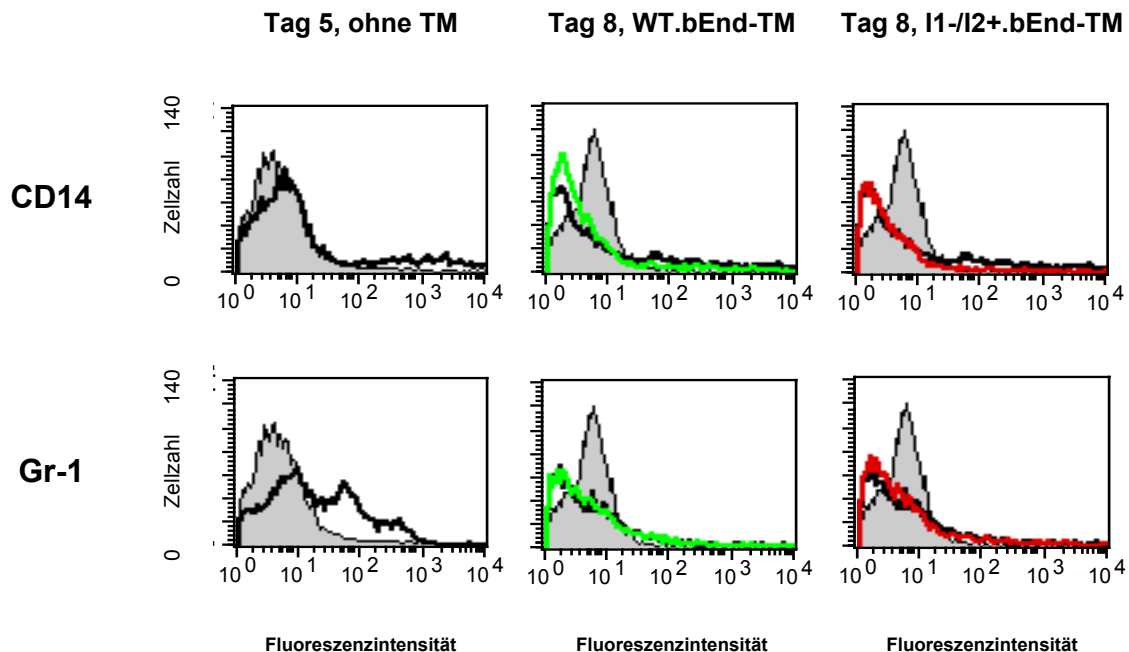
Beim Vergleich der Ausgangspopulation (Abb. 4.2) mit den Populationen an Tag 8 (Abb. 4.10) war in allen Fällen eine deutliche Ausreifung zu beobachten. Nahezu alle Zellen waren positiv für die Marker CD11c, MHC-II, CD80 und CD86 und wiesen lediglich Unterschiede in der Expressionshöhe der einzelnen Moleküle auf. Da zur Erfassung möglicher Ausreifungsunterschiede der Kulturen ein früher Zeitpunkt zur FACS-Analyse gewählt wurde (Tag 8 im Vergleich zu Tag 9 oder 10 zur Generierung vollständig reifer dendritischer Zellen), könnte dies für die uneinheitliche Expression dieser Marker verantwortlich sein. Die drei Populationen untereinander zeigten an Tag 8 aber eine nahezu deckungsgleiche Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle und wiesen unabhängig von erfolgter oder nicht erfolgter Transmigration keine nennenswerten Unterschiede in ihrem Differenzierungsgrad auf.

Um sicher zu gehen, dass die an Tag 5 migrierenden Zellen unreife dendritische Zellen waren, wurden zusätzlich die zurückgewonnenen Zellzahlen der Populationen verglichen, die bei normaler Ausdifferenzierung ohne Transmigration nur leicht abnahmen. Wenn an Tag 5 statt unreifer dendritischer Zellen hauptsächlich eine kontaminierende Zellpopulation migrierte, an Tag 8 aber kein immunzytometrischer Unterschied zu nicht transmigrierten Zellen bestand, hätte sich die Zellzahl der Fraktionen der transmigrierten Zellen im Vergleich zur Fraktion ohne Transmigration durch Absterben des verunreinigenden Zelltyps stärker verringern müssen. Der Vergleich der Zellzahlen der drei Ansätze zeigte jedoch, dass sie sich in allen Fraktionen in ähnlicher Weise, in keinem Fall aber um mehr als 25,5% der an Tag 5 ausgesäten Zellen reduzierten (Tab. 4.4).

Experiment	Ohne TM	TM durch WT.bEnd	TM durch I1-/I2+.bEnd
1	87,5%	88,6%	74,5%
2	97,9%	90,6%	88,5%
3	89,2%	87,7%	90,8%

**Tab. 4.4 Vergleich der Zellzahlentwicklung der Kulturen dendritischer Zellen von Tag 5 bis Tag 8.** Angegeben ist die Prozentzahl der an Tag 8 zurückgewonnenen gegenüber den an Tag 5 ausgesäten Zellen. (TM = Transmigration)

Zusätzlich wurden die Zellen für CD14 (sog. Monozytenmarker) und Gr-1 (sog. Granulozytenmarker) gefärbt. Zu beiden Zeitpunkten war ein sehr kleiner Teil der Zellen positiv für den sog. Monozyten-Marker CD14, dessen Vorkommen auf dendritischen Zellen aber ebenfalls beschrieben ist (Mahnke *et al.*, 1997). Da sich der Anteil der CD14-exprimierenden Zellen vor und direkt nach der Transmigration nicht wesentlich unterschied (Daten nicht gezeigt), ist eine Anreicherung von Monozyten nach der Transmigration auszuschliessen. Ein größerer Anteil der Population an Tag 5 zeigte darüber hinaus eine schwache Expression des oft als Marker für Granulozyten beschriebenen Gr-1-Epitops (Fleming, Fleming & Malek, 1993), dessen Expression aber nach Ausreifung der Kultur verschwand (Abb. 4.10). Auf die Bedeutung von CD14 und Gr-1 zur Unterscheidung dendritischer Zellen von anderen Zelltypen wird in Kap. 5.1 näher eingegangen.



**Abb. 4.10 FACS-Analyse der CD14- und Gr-1-Expression der Kultur dendritischer Zellen an Tag 5 und an Tag 8, mit und ohne Transmigration (TM).** Dargestellt sind die Messungen für die Ausgangspopulation an Tag 5 (fett gedruckte schwarze Linie), die durch WT.bEnd transmigrierte Population an Tag 8 (grün) und die durch I1-/I2+.bEnd transmigrierte Population (rot), jeweils in einem Histogramm mit der nicht transmigrierten Population am Tag 8 (schwarz). Isotyp-Kontrollmessungen sind durch die graue Fläche wiedergegeben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die untersuchten Populationen, unabhängig von der transendothelialen Migration, weder quantitativ noch qualitativ unterschiedlich entwickelten. Darüber hinaus konnte ausgeschlossen werden, dass an Tag 5 neben unreifen dendritischen Zellen eine bedeutende verunreinigende Zellpopulation transmigrierte. Vielmehr wurde gezeigt, dass unreife murine dendritische Zellen teilweise schwach positiv für Gr-1 sind, die Expression dieses Moleküls im Laufe ihrer weiteren Differenzierung jedoch einstellen.

Durch die hier vorgestellten Experimente konnte gesichert werden, dass die an Tag 5 transmigrierenden Zellen, ebenso wie die übrigen Zellen der Gesamtkultur, unreife, zur Ausdifferenzierung befähigte dendritische Zellen waren.

### 4.3.3 ICAM-2-abhängige Transmigration unreifer dendritischer Zellen

Zur Untersuchung der Bedeutung von endotheliale ICAM-2 für die Transmigration unreifer dendritischer Zellen wurden ebenfalls die in Kap. 3.1.2 bereits beschriebenen Endothel-Zelllinien eingesetzt:

1. Wildtyp-Endothelium (WT.bEnd)
2. ICAM-1- und ICAM-2-defizientes Endothelium (I1-/I2-.bEnd)
3. ICAM-2-retransfiziertes doppeldefizientes Endothelium (I1-/I2+.bEnd)

In fünf unabhängigen Experimenten wurde die Transmigration unreifer dendritischer Zellen durch die unterschiedlichen Endotheliume verglichen. Hierzu wurden die bei der Transmigration durch das Wildtyp-Endothelium erreichten Zellzahlen gleich 100% gesetzt und die Ergebnisse bei Verwendung der beiden anderen Endotheliume dazu ins Verhältnis gesetzt. Die so erhaltenen Werte werden mit dem Begriff 'standardisierte Transmigration' beschrieben. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind in Tab. 4.5 wiedergegeben.

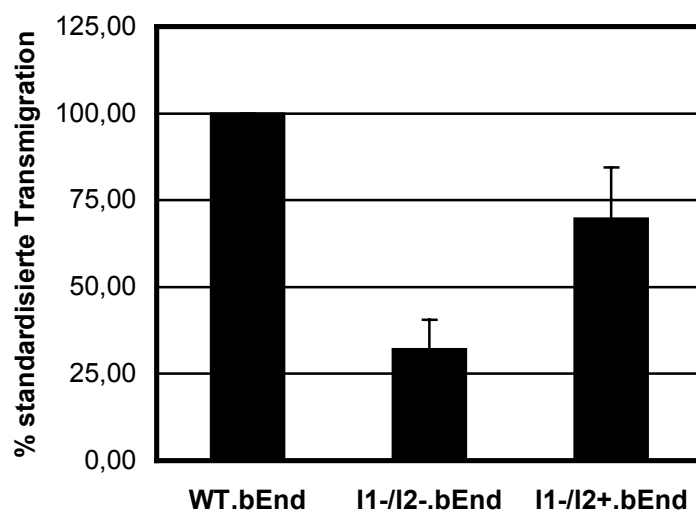
Experiment	WT.bEnd	I1-/I2-.bEnd	I1-/I2+.bEnd	Faktor
1	100 ± 8,4 %	43,7 ± 5,2 %	81,8 ± 7,1 %	1,87
2	100 ± 5,7 %	32,3 ± 1,9 %	55,0 ± 2,6 %	1,70
3	100 ± 9,6 %	21,2 ± 6,5 %	56,2 ± 4,4 %	2,65
4	100 ± 3,4 %	26,9 ± 2,5 %	87,9 ± 3,3 %	3,27
5	100 ± 15,4 %	35,8 ± 3,5 %	67,3 ± 3,3 %	1,88

**Tab. 4.5 Transmigration unreifer dendritischer Zellen durch die drei Endotheliume.**

Aufgeführt ist jeweils die standardisierte Transmigration als Mittelwert der drei Einzelmessungen pro Experiment in Prozent ± Standardabweichung. Der in der rechten Spalte aufgeführte Faktor gibt die Steigerung der Transmigration durch ICAM-2-retransfiziertes Endothelium gegenüber doppeldefizientem Endothelium wieder.

Es konnte gezeigt werden, dass die Transmigration durch ICAM-1- und ICAM-2-doppeldefizientes Endothelium in allen fünf Experimenten deutlich reduziert wurde. Bezogen auf Wildtyp-Endothelium lagen die Werte zwischen 21,2% und 43,7%, durchschnittlich bei  $32,0 \pm 8,6\%$ . Bei der Transmigration durch ICAM-2-retransfiziertes Endothelium wurden demgegenüber wieder erhöhte Werte gemessen. Diese schwankten zwischen 55,0% und 87,9% und ergaben eine mittlere standardisierte Transmigration von  $69,7 \pm 14,8\%$  (Abb. 4.11). Wie aus

Tab. 4.5 ersichtlich, steigerte sich beim Vergleich von doppeldefizientem und ICAM-2-retransfiziertem Endothelium die Transmigrationsrate der unreifen dendritischen Zellen um den Faktor 1,70 bis 3,27, im Mittel um das  $2,3 \pm 0,7$ -fache. Für die ca. 30% geringere Transmigrationsrate der unreifen dendritischen Zellen durch ICAM-2-retransfiziertes gegenüber Wildtyp-Endothelium sind folgende zwei Erklärungen denkbar: Entweder ist die Transmigration neben ICAM-2 auch von dem auf retransfiziertem Endothelium fehlenden ICAM-1 abhängig, oder eine geringere Expression von ICAM-2 auf retransfiziertem Endothelium (vgl. FACS-Analyse in Kap. 4.1.2.1) erlaubt keine vollständige Rekonstitution der normalen Transmigrationsrate. Hierauf wird in Kap. 5.3 näher eingegangen. Trotz der relativ großen Streuung der Werte zwischen den einzelnen Experimenten konnte mit Hilfe der drei verschiedenen Endotheliume klar gezeigt werden, dass ICAM-2 eine bedeutende Rolle bei der endothelialen Transmigration unreifer dendritischer Zellen inne hat. Beim Vergleich der Mittelwerte für doppeldefizientes bzw. ICAM-2-retransfiziertes Endothelium ergab sich ein theoretischer ICAM-2-Beitrag zur Transmigration unreifer dendritischer Zellen von mehr als einem Drittel (ca. 38%).



**Abb. 4.11 Vergleich der standardisierten Transmigration unreifer dendritischer Zellen durch die drei im Text beschriebenen Endotheliume.** Unreife dendritische Zellen transmigrieren schlechter durch I1-/I2-.bEnd ( $p < 0,001$ ) und I1-/I2+.bEnd ( $p = 0,01$ ) als durch WT.bEnd. Durch das ICAM-2-retransfizierte Endothelium migrieren aber deutlich mehr unreife dendritische Zellen als durch ICAM-1/ICAM-2-doppeldefizientes Endothelium ( $p = 0,002$ ). Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten. Aufgrund der Standardisierung der Einzelergebnisse für die Transmigration durch WT.bEnd auf 100% ist hierfür keine Standardabweichung anzugeben.

#### 4.3.4 ICAM-2-abhängige Transmigration bei Blockade der $\beta_2$ -Integrine durch einen monoklonalen Antikörper

Nachdem im vorangehenden Teil der Arbeit ein deutlicher Beitrag von ICAM-2 zur transendothelialen Migration unreifer dendritischer Zellen gezeigt worden war, sollte nun untersucht werden, ob  $\beta_2$ -Integrine die leukozytären Liganden für diese ICAM-2-vermittelte Interaktion waren.

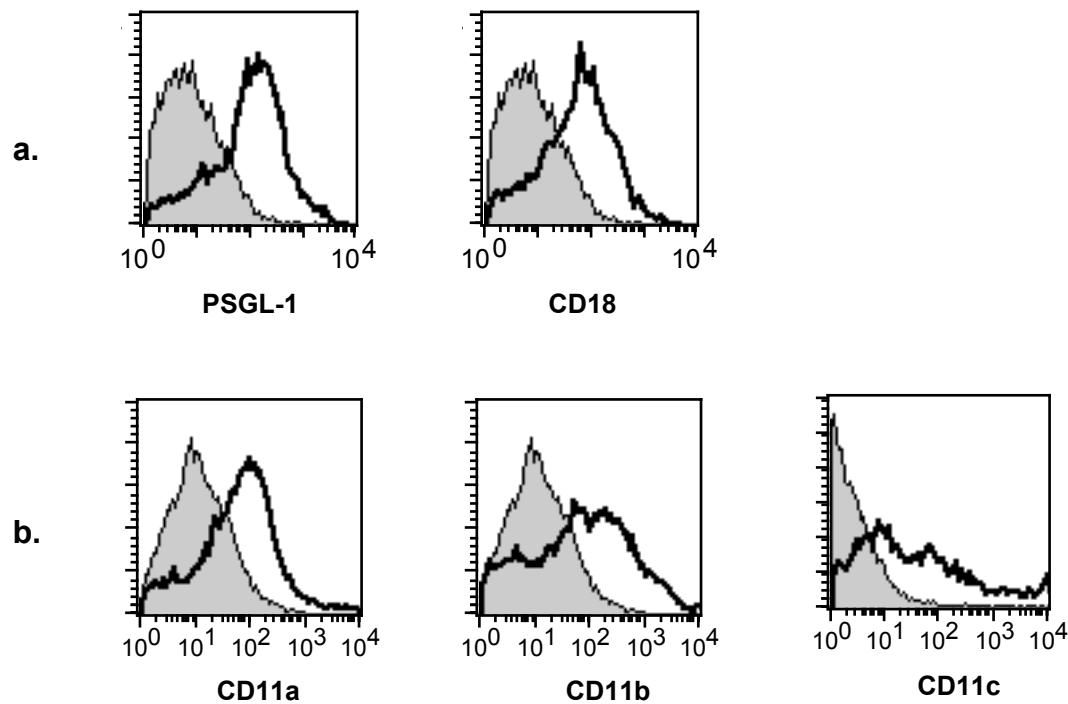
Hierzu stand der gegen die  $\beta_2$ -Kette der Integrine (CD18) gerichtete, monoklonale Antikörper GAME-46 (Driessens *et al.*, 1996) zur Verfügung. Wie von anderen Gruppen bereits gezeigt wurde, kann dieser Antikörper funktionelle Interaktionen zwischen  $\beta_2$ -Integrinen und ICAM-1 bzw. ICAM-2 *in vitro* (Driessens *et al.*, 1996) wie *in vivo* (Foy & Ley, 2000; Ridger *et al.*, 2001) unterbinden. Als Negativ-Kontrolle stand der gegen den P-Selektin-Liganden PSGL-1 gerichtete monoklonale Antikörper 4RB12 zur Verfügung, für den *in vivo* keine die Migration inhibierende Wirkung gefunden werden konnte (Pendl *et al.*, 2002).

##### 4.3.4.1 Test der Antikörperbindung an unreife dendritische Zellen

Zunächst musste gezeigt werden, dass die verwendeten Antikörper tatsächlich spezifisch ihre Epitope auf den unreifen dendritischen Zellen erkannten. Hierzu diente die in Abb. 4.12 dargestellte FACS-Analyse.

Aus Abb. 4.12a geht klar hervor, dass sowohl der eingesetzte CD18-Antikörper als auch der gegen PSGL-1 gerichtete Antikörper spezifisch an die entsprechenden Epitope auf den unreifen dendritischen Zellen banden. Sie waren somit geeignet, in funktionellen Experimenten eingesetzt zu werden.

Darüber hinaus konnte durch Färbungen für die  $\alpha$ -Ketten der  $\beta_2$ -Integrine gezeigt werden, dass die dendritischen Zellen LFA-1 ( $\alpha$ -Kette CD11a), Mac-1 ( $\alpha$ -Kette CD11b) und p150.95 ( $\alpha$ -Kette CD11c) auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb. 4.12b) und damit mögliche Interaktionsmoleküle für ICAM-1 und ICAM-2 vorhanden waren.



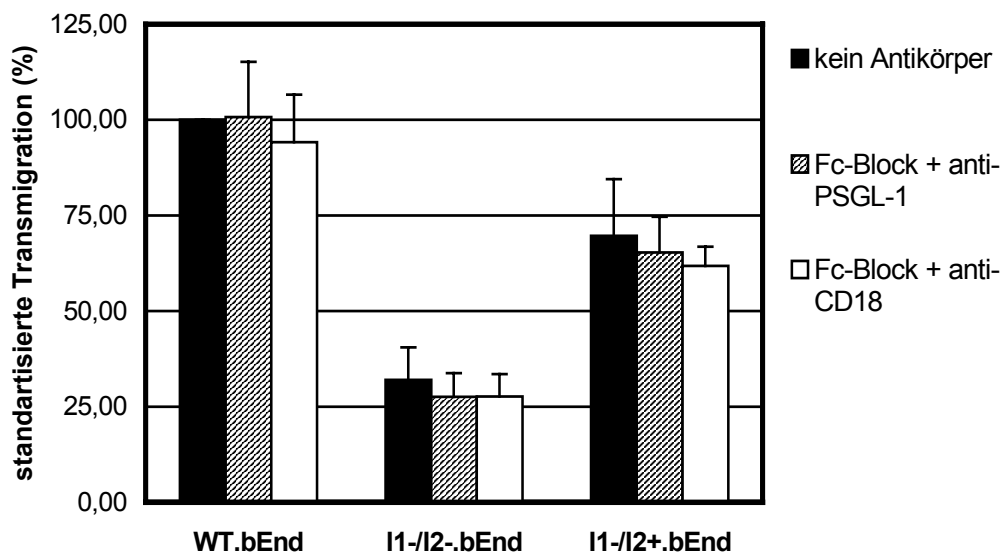
**Abb. 4.12** FACS-Analyse zur Epitoperkennung der eingesetzten Antikörper (a) und zur Bestimmung der Expression von  $\beta_2$ -Integrinen auf unreifen dendritischen Zellen (b). Die Färbungen wurden mit den folgenden Erstantikörpern durchgeführt: (a) anti-PSGL-1-Antikörper 4RB12; anti-CD18-Antikörper GAME-46; (b) anti-CD11a-Antikörper M17/4 (LFA-1); anti-CD11b-Antikörper M1/70 (Mac-1); anti-CD11c-Antikörper HL3 (p150.95). Dargestellt ist die Fluoreszenz-Intensität nach Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern (fett gedruckte, schwarze Linie) sowie bei Einsatz der Isotypkontrollen (feine schwarze Linie mit grau unterlegter Fläche).

#### 4.3.4.2 Transmigration unreifer dendritischer Zellen in Gegenwart eines blockierenden CD18-Antikörpers

Nach den oben beschriebenen Voruntersuchungen konnte der blockierende monoklonale  $\beta_2$ -Integrin-Antikörper GAME-46 in den Transmigrationsexperimenten eingesetzt werden. Die unreifen dendritischen Zellen wurden dazu nach Resuspension in der erforderlichen Menge Transmigrationsmedium zunächst in drei Portionen aufgeteilt. Zwei dieser Anteile wurden für 20 min mit einem die Fc-Rezeptoren der dendritischen Zellen blockierenden Antikörper (anti-CD16/CD32-Antikörper, Fc-Block) bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der funktionellen Antikörper an die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Anschließend wurde beiden Ansätzen für weitere 20 min der nicht blockierende PSGL-1-Antikörper 4RB12 bzw. der blockierende CD18-Antikörper GAME-46

zugesetzt, während der dritte Ansatz ohne jegliche Zusätze blieb. Die drei Zellsuspensionen der unreifen dendritischen Zellen wurden vor der Zugabe in die Filtereinsätze vorsichtig resuspendiert, so dass bei Beurteilung durch ein Lichtmikroskop Einzelzellsuspensionen vorlagen. Die weitere Durchführung und Auswertung der Transmigrationstests entsprach der in vorhergehenden Kapiteln bereits beschriebenen.

Die Resultate zeigten, dass der anti-CD18-Antikörper GAME-46 keinen Einfluss auf die Transmigrationsfähigkeit unreifer dendritischer Zellen hatte, obwohl die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1, Mac-1 und p150.95 auf ihrer Oberfläche exprimiert waren (Abb. 4.12b). Wie aus Abb. 4.13 ersichtlich ist, wurde weder die Transmigration durch Wildtyp-Endothelium, noch die durch ICAM-1- und ICAM-2-defizientes Endothelium, noch die durch ICAM-2-retransfiziertes Endothelium durch den Einsatz von GAME-46 signifikant verändert. Der gegen PSGL-1 gerichtete Kontrollantikörper 4RB12 blieb erwartungsgemäß ohne Effekt.



**Abb. 4.13 ICAM-2-abhängige Transmigration unreifer dendritischer Zellen bei Blockade der  $\beta_2$ -Integrine.** Keiner der verwendeten Antikörper bewirkt eine signifikante Änderung der Transmigrationsrate der unreifen dendritischen Zellen (für alle Bedingungen  $p > 0,05$ ). Vor Einsatz im Transmigrationstest blieb ein Teil der dendritischen Zellen unbehandelt ( $n=5$ ) oder wurde jeweils mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Fc-Block (anti-CD16/CD32-Antikörper 2.4G2) und 40  $\mu\text{g/ml}$  PSGL-1- bzw. CD18-Antikörper (4RB12,  $n=5$  bzw. GAME-46,  $n=3$ ) inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der Ergebnisse der Einzelerperimente. Aufgrund der Standardisierung der Einzelerperimente für die Transmigration durch WT.bEnd auf 100% ist hierfür keine Standardabweichung anzugeben.

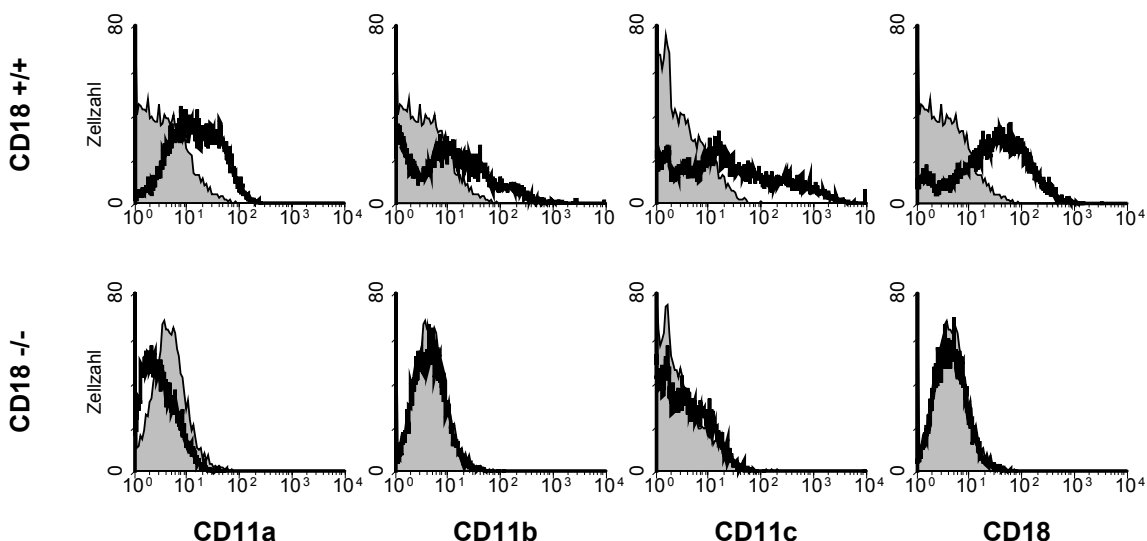


Hervorzuheben ist, dass die Steigerung der Transmigration durch ICAM-2-retransfiziertes Endothelium also auch bei Blockade der leukozytären  $\beta_2$ -Integrine erhalten blieb. Dies wies auf die Existenz möglicher weiterer Liganden für ICAM-2 hin, die unabhängig von CD18-Molekülen waren. Diese Erkenntnisse veranlassten zur weiteren Abklärung des Sachverhaltes mit Hilfe der im Folgenden dargestellten Untersuchungen.

#### 4.3.5 Transendotheliale Migration CD18-defizienter, unreifer dendritischer Zellen

Nachdem die Transmigration unreifer dendritischer Zellen nicht durch den blockierenden CD18-Antikörper GAME-46 beeinflusst werden konnte, sollten diese Ergebnisse mit Hilfe dendritischer Zellen aus CD18-defizienten Mäusen verifiziert werden. Hierzu wurde Knochenmark aus CD18-defizienten 129Sv/C57BL6(H-2<sup>b</sup>)-Mäusen und zur Kontrolle aus CD18-positiven Mäusen desselben Genotyps isoliert und wie unter Kap. 3.3.1 beschrieben kultiviert. In vier unabhängigen Experimenten wurden die so gewonnenen unreifen dendritischen Zellen im Transmigrationsexperiment (Kap. 3.6.3) eingesetzt.

Wie die FACS-Analyse in Abb. 4.14 zeigt, waren die aus CD18-defizienten



**Abb. 4.14 Expression der  $\beta_2$ -Integrine auf CD18-positiven und CD18-defizienten, unreifen dendritischen Zellen.** Die Zellen wurden mit den folgenden Erstantikörpern inkubiert: anti-CD11a-Antikörper M17/4 (LFA-1), anti-CD11b-Antikörper M1/70 (Mac-1), anti-CD11c-Antikörper HL3 (p150.95), anti-CD18-Antikörper M18/2 (fett gedruckte schwarze Linien) sowie einer Isotyp-Kontrolle (grau unterlegte Histogramme).

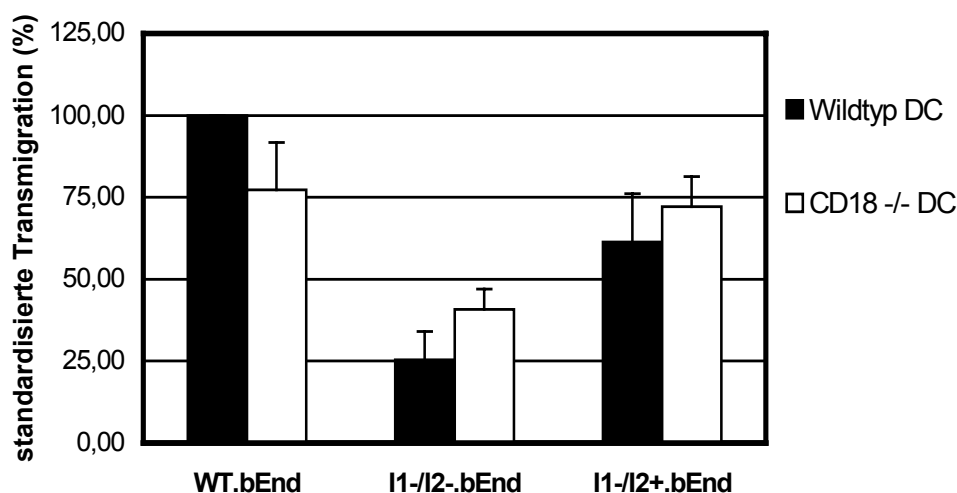
129Sv/C57BL6(H-2<sup>b</sup>)-Mäusen gewonnenen unreifen dendritischen Zellen erwartungsgemäß negativ für die CD18-Kette und gleichzeitig negativ für die  $\alpha$ -Ketten der  $\beta_2$ -Integrine LFA-1, Mac-1 und p150.95, die bei Fehlen der  $\beta$ -Kette instabil sind (Wilson *et al.*, 1993). In der Expression der übrigen Marker unterschieden sie sich nicht nennenswert von den CD18-positiven Zellen desselben genotypischen Hintergrundes oder von den aus Balb/c-Mäusen gewonnenen (Daten nicht gezeigt).

Tab. 4.6 gibt die Ergebnisse der Einzelexperimente wieder, während Abb. 4.15 die Daten aller vier Experimente zusammenfasst. Die CD18-positiven, unreifen dendritischen Zellen aus 129Sv/C57BL6(H-2<sup>b</sup>)-Mäusen migrierten in sehr ähnlicher Weise wie die in Kap. 4.3.3 vorgestellten Zellen aus Balb/c-Mäusen. Die auf 100% standardisierte Transmigration dieser Zellen durch Wildtyp-Endothelium wurde bei Fehlen von endotheliale ICAM-1 und ICAM-2 auf durchschnittlich  $25,4 \pm 12,7\%$  ( $32,0 \pm 8,6\%$  für Balb/c) reduziert. Durch ICAM-2-retransfiziertes Endothelium migrierten mit  $61,3 \pm 19,4\%$  ( $69,7 \pm 14,8\%$  für Balb/c) des Wildtyp-Wertes wieder deutlich mehr Zellen, was einer durchschnittlichen Steigerung der Transmigration um den Faktor  $2,7 \pm 0,9$  ( $2,3 \pm 0,7$  für Balb/c) entsprach.

	Experiment	WT.bEnd	I1-/I2-.bEnd	I1-/I2+.bEnd	Faktor
<b>Wildtyp DC</b>	1	100 $\pm$ 2,7 %	23,6 $\pm$ 2,8 %	54,2 $\pm$ 5,3 %	2,3
	2	100 $\pm$ 3,0 %	42,7 $\pm$ 2,5 %	90,3 $\pm$ 2,8 %	2,1
	3	100 $\pm$ 7,7 %	23,2 $\pm$ 3,8 %	51,0 $\pm$ 6,7 %	2,2
	4	100 $\pm$ 6,5 %	12,1 $\pm$ 1,6 %	49,6 $\pm$ 3,4 %	4,1
<b>CD18 -/- DC</b>	1	87,2 $\pm$ 10,0 %	44,3 $\pm$ 4,8 %	80,9 $\pm$ 2,4 %	1,8
	2	73,3 $\pm$ 5,1 %	45,3 $\pm$ 0,4 %	86,0 $\pm$ 12,3 %	1,9
	3	78,7 $\pm$ 6,9 %	32,7 $\pm$ 3,2 %	59,3 $\pm$ 5,5 %	1,8
	4	69,8 $\pm$ 3,4 %	40,7 $\pm$ 2,8 %	62,2 $\pm$ 2,9 %	1,5

**Tab. 4.6 Einzelergebnisse zur ICAM-2-abhängigen Transmigration CD18-positiver und CD18-defizienter, unreifer dendritischer Zellen.** Aufgeführt ist jeweils die standardisierte Transmigration als Mittelwert der drei Einzelmessungen pro Experiment in Prozent  $\pm$  Standardabweichung. Der in der rechten Spalte aufgeführte Faktor gibt die Steigerung der Transmigration durch ICAM-2-retransfiziertes Endothelium gegenüber doppeldefizientem Endothelium wieder.

Die CD18-defizienten, unreifen dendritischen Zellen zeigten mit durchschnittlich  $77,3 \pm 7,7\%$  eine gegenüber den CD18-positiven dendritischen Zellen geringfügig verminderte Transmigration durch das Wildtyp-Endothelium. Demnach könnte ein kleiner Teil der Transmigration von  $\beta_2$ -Integrinen abhängig sein. Dieser scheint aber von eher untergeordneter Bedeutung zu sein, da der Einsatz des blockierenden CD18-Antikörpers in Kap. 4.3.4.2 keine Wirkung zeigte (Abb. 4.13). Bei Abwesenheit von endotheliale ICAM-1 und ICAM-2 wurde die Transmigration CD18-defizienter dendritischer Zellen auf  $40,8 \pm 5,6\%$  reduziert und erreichte mit  $72,1 \pm 13,3\%$  durch ICAM-2-retransfiziertes Endothelium wieder die bei Transmigration durch Wildtyp-Endothelium gemessenen Werte. Diese ICAM-2-bedingte Steigerung der Transmigrationsrate lässt den Schluss zu, dass ein  $\beta_2$ -Integrin-unabhängiger ICAM-2-Beitrag zur endothelialen Transmigration unreifer dendritischer Zellen besteht. Die vergleichbaren Transmigrationsraten CD18-defizienter dendritischer Zellen durch Wildtyp-Endothelium und ICAM-2-retransfiziertes Endothelium zeigen außerdem, dass ICAM-1 in Abwesenheit der  $\beta_2$ -Integrine keine Rolle spielt, da sich in diesem Fall die beiden Transmigrationsraten hätten unterscheiden müssen. Ein  $\beta_2$ -Integrin-unabhängiger Ligand ist demnach auf unreifen dendritischen Zellen nur für ICAM-2, nicht jedoch für ICAM-1 anzunehmen.



**Abb. 4.15 Vergleich der Transmigration CD18-positiver und CD18-defizienter, unreifer dendritischer Zellen.** Lediglich die Transmigration unreifer dendritischer Zellen durch WT.bEnd wird durch die Abwesenheit von CD18 reduziert ( $p < 0,01$ ), für alle anderen Bedingungen unterscheiden sich die Werte für Wildtyp-DC und CD18-defiziente DC nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der Ergebnisse der Einzelexperimente ( $n=4$ ). Aufgrund der Standardisierung der Einzelexperimente für die Transmigration durch WT.bEnd auf 100% ist hierfür keine Standardabweichung anzugeben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass auch bei Abwesenheit der  $\beta_2$ -Integrine auf unreifen dendritischen Zellen eine ICAM-2-Abhängigkeit der Transmigration besteht. Diese könnte auf der Interaktion mit einem noch unbekanntem Liganden beruhen. Im humanen System wurde mit DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM grabbing nonintegrin) bereits ein solcher Ligand gefunden (Geijtenbeek *et al.*, 2000a). Inwieweit dieses oder verwandte Moleküle für die Vermittlung der ICAM-2-abhängigen Transmigration unreifer muriner dendritischer Zellen verantwortlich sein kann, wird in Kap. 5.3 diskutiert.

## 5 Diskussion

Eine besondere Eigenschaft der Leukozyten ist ihre Fähigkeit, das Blutgefäßsystem durch transendotheliale Migration verlassen zu können. Im Rahmen der konstitutiven Immunüberwachung des Organismus wandern auch unreife dendritische Zellen aus dem Blut in periphere Gewebe ein, um hier ihre spezifischen Funktionen als zunächst Antigen-internalisierende und später Antigen-präsentierende Zellen übernehmen zu können. Während die Schritte der Extravasation für andere Leukozytenarten recht gut untersucht sind und eine Reihe beteiligter Adhäsionsmoleküle identifiziert werden konnte, sind die Verhältnisse für dendritische Zellen bis heute noch weitgehend ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit zeigt anhand von in vitro-Experimenten, dass unreife, nicht jedoch reife murine dendritische Zellen zur transendothelialen Migration fähig sind. Darüber hinaus kann ein erheblicher Beitrag des 'inter-cellular-adhesion-molecule-2' (ICAM-2) für die endotheliale Adhäsion und Transmigration unreifer dendritischer Zellen nachgewiesen werden. Durch Experimente mit blockierenden Antikörpern und defizienten Mäusen wird gezeigt, dass die beobachteten ICAM-2-vermittelten Interaktionen zwischen den unreifen dendritischen Zellen und dem Endothel unabhängig von bekannten ICAM-2-Liganden der  $\beta_2$ -Integrin-Familie sind. Die vorliegenden Ergebnisse weisen damit auf die Existenz weiterer,  $\beta_2$ -Integrin-unabhängiger Liganden für endotheliales ICAM-2 auf den dendritischen Zellen hin.

### **5.1 In vitro-Differenzierung muriner dendritische Zellen**

In dieser Arbeit wurden aus murinem Knochenmark differenzierte dendritische Zellen eingesetzt. Um die Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse mit vorangegangenen funktionellen Studien mit murinen dendritischen Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen nach denselben Standardprotokollen hergestellt (Grabbe *et al.*, 2002; Lappin *et al.*, 1999; Pendl *et al.*, 2002). Durch den Einsatz von GM-CSF, IL-4 und in späteren Kulturphasen auch den von LPS war es möglich, unreife und reife dendritische Zellen aus murinem Knochenmark zu differenzieren. Im Einklang mit bisher gemachten

Beobachtungen konnte durch Kultivierung der Knochenmarkzellen in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF eine Population mit dem für unreife dendritische Zellen erwarteten Profil von Oberflächenmolekülen differenziert werden. Wie in eingangs erwähnten Studien fanden sich auf den Zellen der heterogenen Population an Tag 5 unterschiedliche Expressionslevel der Oberflächenmoleküle MHC-II, CD11c, CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und DEC-205. Außerdem definierte sich diese Zellpopulation auch durch ihre Fähigkeit, sich nach geeigneter Stimulation (LPS) zu reifen dendritischen Zellen zu entwickeln sowie durch die Abwesenheit bestimmter Markermoleküle anderer Zelltypen auf ihrer Oberfläche, wie CD3 für T-Lymphozyten, CD19 für B-Lymphozyten und NK1.1 für natürliche Killerzellen. Die beschriebene Population unreifer dendritischer Zellen entspricht damit dem erwarteten Bild.

In diesem Zusammenhang ist die Betrachtung der ebenfalls auf den Zellen gefundenen Moleküle Gr-1 und CD14 interessant: Gr-1 ist vielfach als Granulozytenmarker beschrieben und diente in einer vorangegangenen Arbeit sogar zur Unterteilung der Kultur an Tag 6 in eine Granulozyten-angereicherte Population einerseits und eine Population dendritischer Zellen andererseits (Lappin *et al.*, 1999). Nach den in Kap. 4.3.2 vorgestellten Ausreifungsexperimenten und den Untersuchungen von Fleming *et al.* im Jahre 1993 muss aber davon ausgegangen werden, dass Gr-1 nicht nur auf Granulozyten, sondern auch auf anderen, noch nicht voll ausdifferenzierten myeloiden Zellen wie unreifen dendritischen Zellen nachweisbar ist und sich erst nach erfolgter Ausreifung als sogenannter 'lineage-marker' eignet (Fleming *et al.*, 1993). Außerdem muss die Expressionshöhe des Moleküls berücksichtigt werden: Nach persönlichen Informationen von Prof. S. Grabbe (Universitäts-Hautklinik, Münster) liegt die in dieser Arbeit beobachtete Gr-1-Expression der unreifen dendritischen Zellen deutlich niedriger als die von Granulozyten und ist keineswegs ungewöhnlich. Die zunächst Gr-1-positiven Zellen differenzierten sich im Laufe der Kultur zu reifen dendritischen Zellen und waren dann negativ für Gr-1.

Auch der Nachweis des oft als Monozytenmarker verwendeten Moleküls CD14 widerspricht nicht der Bezeichnung der Zellpopulation an Tag 5 als unreife

dendritische Zellen, da seine Existenz auf dendritischen Zellen nicht nur in dieser, sondern auch in vorangegangenen Studien gefunden werden konnte (Geijtenbeek *et al.*, 2000a; Mahnke *et al.*, 1997). Dies ist vermutlich durch die besonders enge Verwandtschaft zwischen Monozyten und dendritischen Zellen zu erklären, die sich z. B. daran ablesen lässt, dass sich sowohl aufgereinigte murine Blut-Monozyten wie auch frisch isolierte murine Knochenmarkzellen bei identischer Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 zu phänotypisch und funktionell gleichwertigen dendritischen Zellen differenzieren lassen (Schreurs *et al.*, 1999).

Trotz der unzweifelhaft großen immunologischen Bedeutung der unreifen dendritischen Zellen ist dieser Zelltyp bis heute in der Literatur nur unzureichend definiert. Dieses Differenzierungsstadium wird daher nicht an einem einheitlichen Oberflächenmolekülmuster der einzelnen Zelle festgemacht, sondern drückt sich auf Grund der in Entwicklung befindlichen Zellen gerade durch die Heterogenität der Population aus. Möglicherweise ist neben den funktionellen Fähigkeiten der Zellen und ihrer Ausreifungsfähigkeit zu reifen dendritischen Zellen das Molekül DEC-205 der beste positiv-Marker für die Ausrichtung der Kultur hin zu reifen dendritischen Zellen: DEC-205 wurde von Tag 5 bis zur vollständigen Ausreifung der Kultur kontinuierlich exprimiert, ist aber weder auf Monozyten noch auf Makrophagen nachweisbar (Inaba *et al.*, 1995; Randolph *et al.*, 1999). Für gezieltere funktionelle Studien mit unreifen dendritischen Zellen wäre es für die Zukunft wünschenswert, Markermoleküle zu definieren, die exklusiv im genannten Differenzierungsstadium exprimiert werden und so die Gewinnung von Zellen identischen Reifegrades zulassen. Für ausdifferenzierte dendritische Zellen ist diese Idealsituation heute bereits annähernd erreicht:

Nach 48-stündiger Zugabe des Ausreifungsstimulanz Lipopolysaccharid (LPS) zum Kulturmedium, zusätzlich zu GM-CSF und IL-4, konnten auf den Zellen hohe Expressionslevel von MHC-II-Molekülen, den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 und CD86 sowie ICAM-1 und CD11c nachgewiesen werden. Sie entsprachen damit dem typischen Phänotyp reifer dendritischer Zellen. Wie im Rahmen weiterer Studien gefunden wurde, weisen Zellen, die

unter den gleichen Kulturbedingungen gewonnen wurden auch in funktioneller Hinsicht wichtige Eigenschaften dendritischer Zellen auf (Labeur *et al.*, 1999; Mayordomo *et al.*, 1995). Sie sind befähigt zur:

- Pino- und Phagozytose
- Migration zu drainierenden Lymphknoten nach subkutaner Injektion
- Initiierung antigenspezifischer Immunantworten in vivo
- Aktivierung naiver T-Zellen
- Produktion bestimmter Zytokine

Zusammengenommen kann daher als gesichert gelten, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen unreife und reife dendritische Zellen repräsentieren. Sie sind damit wertvolle biologische Hilfsmittel, um aussagekräftige Untersuchungsergebnisse über die funktionellen Eigenschaften dieses Zelltyps zu gewinnen.



## **5.2 Transendotheliale Migration unreifer dendritischer Zellen**

Die hier vorgestellten Transmigrationsexperimente mit unreifen und reifen murinen dendritischen Zellen durch unstimulierte Wildtyp-Endotheliumzellrasen zeigen, dass unreife Zellen ca. 100-fach besser transmigrieren als ausgereifte dendritische Zellen.

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert wurde, konnten unreife und reife dendritische Zellen durch die angewandten Kulturbedingungen und die sich anschließenden morphologischen und immunzytometrischen Kontrolluntersuchungen auf verlässliche Art und Weise gewonnen und unterschieden werden. Die genaue Charakterisierung der transmigrierenden Zellpopulation identifizierte die transmigrierenden Zellen eindeutig als unreife dendritische Zellen und schloss damit aus, dass eine kontaminierende Zellpopulation die Ergebnisse verfälschte. Darüber hinaus konnte durch die Überprüfung des lückenlosen Schlusses der Endothelzellrasen auf den Filtereinsätzen gesichert werden, dass die Zellen tatsächlich transendothelial migrierten und nicht etwa nur freiliegende Filterporen durchwanderten.

Im Vergleich zu Beobachtungen mit Lymphozyten, bei denen ca. 36% der eingesetzten Zellen einen unstimulierten Endothelzellrasen passierten (Lyck *et al.*, 2003), ist die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Transmigrationsrate von ca. 3% für unreife dendritische Zellen als relativ gering einzustufen, liegt aber in einer ähnlichen Größenordnung wie die für humane Monozyten gefundene Transmigrationsrate von 5-8% durch unstimulierte HUVEC (Shang & Issekutz, 1999). Obwohl die Faktoren, welche die Migrationsrate bestimmen, hier nicht näher untersucht worden sind, können folgende Hypothesen bei der Einordnung der erzielten Ergebnisse hilfreich sein:

- a. Aufgrund ihrer unterschiedlichen ICAM-1- und ICAM-2-Expression eignen sich die eingesetzten murinen Gehirn-Endotheliome ideal zur Detektion ICAM-vermittelter Adhäsions- und Transmigrationsbeiträge. Gleichzeitig könnten die Endotheliome, deren Ursprungszellen aus dem Gehirn von Mäusen isoliert wurden, bestimmte organspezifische Eigenschaften

aufweisen, die sie von anderen Endothelien innerhalb des Körpers unterscheiden. Die Transmigrationsrate unreifer dendritischer Zellen durch bEnd-Zellen könnte daher im Vergleich zu anderen Endothelzellen durchaus verschieden sein.

- b. Unreife dendritische Zellen neigen in den Kulturgefäßen zur schwachen Adhäsion untereinander. Bei der Kontrollzelllinie 32Dcl3 war eine solche Adhäsionsneigung nicht zu beobachten. Obwohl in Vereinzelungsexperimenten belegt werden konnte, dass die dendritischen Zellen nur schwach aneinander hafteten (Kap. 4.1.1), könnte diese Interaktion dennoch eine höhere Transmigrationsrate verhindern. In vivo spielt die schwache Aggregationsneigung aufgrund der hohen Durchmischung der dendritischen Zellen mit anderen Zelltypen des Blutes vermutlich aber keine entscheidende Rolle.

Da derartige Transmigrationsexperimente mit murinen dendritischen Zellen erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, muss zunächst offen bleiben, ob der Grund für die recht geringe Transmigrationsrate der Zellen im experimentellen Ansatz zu suchen ist oder die tatsächlichen Verhältnisse zu Lymphozyten und Monozyten widerspiegelt.

In einer Studie mit aus humanen Monozyten differenzierten dendritischen Zellen konnte die anfängliche Transmigrationsrate von 10% durch ruhendes Endothel nach anlegen eines Chemokin-Gradienten um das zwei- bis dreifache gesteigert werden (D'Amico *et al.*, 1998). Die Wirkung der Chemokine auf die Transmigration unreifer und reifer muriner dendritischer Zellen muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Nach bisherigen Erkenntnissen im humanen System bestimmt die Expression spezifischer Chemokine und Chemokinrezeptoren nicht nur die Transmigrationsrate, sondern erklärt auch die unterschiedliche, gewebespezifische Migration unreifer und reifer dendritischer Zellen. So konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass unreife dendritische Zellen unter anderem die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 exprimieren und dadurch verstärkt in Gegenwart verschiedener inflammatorischer Chemokine wie MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  oder RANTES (vgl. Kap.

2.2.1.2) migrieren. Reife dendritische Zellen sprechen dagegen auf die genannten Chemokine kaum noch an, sondern exprimieren vermehrt den Chemokinrezeptor CCR7, der ihre besondere Chemotaxis zu den vor allem in lymphatischen Organen produzierten Chemokinen MIP-3 $\beta$  und SLC ('secondary lymphoid-tissue chemokine') vermittelt (Lin *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1999b; Sozzani *et al.*, 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch eine weitere Studie mit aus humanen Monozyten differenzierten dendritischen Zellen: Nach Stimulation mit LPS, IL-1, TNF- $\alpha$  oder CD40 wurde die Chemotaxis der Zellen zu inflammatorischen Chemokinen innerhalb von weniger als einer Stunde deutlich inhibiert (Lin *et al.*, 1998) und ihr Ansprechen auf MIP-3 $\beta$  deutlich gesteigert. Da die bei den vergleichenden Experimenten der vorliegenden Arbeit eingesetzten reifen dendritischen Zellen ebenfalls mit LPS stimuliert wurden, ist anzunehmen, dass sie dem hier beschriebenen 'reifen Migrationstyp' entsprachen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit in vivo gewonnenen Erkenntnissen, wonach unreife, aber nicht reife murine dendritische Zellen nach i.v. Injektion in entzündete Gewebe auswanderten, demgegenüber aber nur reife dendritische Zellen nach s.c. Injektion in die drainierenden Lymphknoten migrierten (Pendl *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 1999).

Abschließend muss betont werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit trotz der relativ geringen Transmigrationsraten der dendritischen Zellen verlässliche Aussagen über die ICAM-2-Abhängigkeit der Migration unreifer dendritischer Zellen gewonnen wurden, da eine Transmigrationsrate von 3% immerhin 30.000 transmigrierenden dendritischen Zellen pro Filtereinsatz entspricht.

### **5.3 Bedeutung von ICAM-2**

In vielen Studien wurden bereits die an der leukozytären Adhäsion und transendothelialen Migration beteiligten Moleküle untersucht. Dabei konnten vor allem umfassende Erkenntnisse über die Biologie der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und der Monozyten gewonnen werden. Demgegenüber ist die Zahl der Studien mit dendritischen Zellen sehr gering, obwohl diesen Zellen immense Bedeutung bei der Stimulation und Regulation von Immunreaktionen zukommt.

#### **5.3.1 Adhäsionsexperimente**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Adhäsions- und Transmigrationsexperimenten ein bedeutender Beitrag des ICAM-2 zur endothelialen Adhäsion und Transmigration unreifer dendritischer Zellen identifiziert werden. Beim Vergleich der Adhäsion der dendritischen Zellen an ICAM-1/ICAM-2-doppeldefizientem und ICAM-2-retransfiziertem Endothelium, wurde bei Anwesenheit von ICAM-2 in fünf unabhängigen Experimenten eine durchgehend deutlich verbesserte Adhäsionsfähigkeit gefunden: Die auf 5,3 bis 29,8% reduzierte Adhäsionsrate an doppeldefizientem I1-/I2- im Vergleich zu WT. steigerte sich an ICAM-2-retransfiziertem I1-/I2+ auf Werte zwischen 38,5 und 112,7%. Bei einem Vergleich der Adhäsionsraten innerhalb der Einzelexperimente bedeutet dies eine deutliche Adhäsionssteigerung durch ICAM-2 um den Faktor 2,6 bis 15,0 (Kap. 4.2.1).

Trotz größter Bemühung um die Einhaltung standardisierter Versuchsbedingungen (Kap. 3.6) waren die hohen Schwankungen der durch ICAM-2-vermittelten Verbesserung der Adhäsionsfähigkeit der unreifen dendritischen Zellen nicht zu eliminieren. Dabei ist zu berücksichtigen, dass für die einzelnen Experimente erstens jeweils frische dendritische Zellen präpariert werden mussten und zweitens drei unabhängige Endothelzelllinien kultiviert wurden, die dann zum gleichen Zeitpunkt in – untereinander und zum Vorexperiment – vergleichbarem Zustand vorliegen mussten. Zur Kontrolle der Integrität der Endothelzellrasen wurden sie vor und nach den Adhäsionsexperimenten unter dem Lichtmikroskop überprüft und Kontrolluntersuchungen bezüglich ihrer

ICAM-1- und ICAM-2-Expression durchgeführt. Danach könnten möglicherweise Schwankungen der ICAM-2-Expression der retransfizierten Endothelium-Zellen für die variablen Ergebnisse mitverantwortlich sein. In FACS-Analysen wurden auf retransfizierten Zellen zwischen 53% und 85% der auf Wildtyp-Zellen gemessenen ICAM-2-Expression bestimmt. Diese auf Einzelzellmessungen beruhenden Werte erscheinen zunächst verlässlicher als die für die Gesamtheit der Zellen eines Versuchsansatzes ermittelten Werte des cell-surface-ELISA, wonach kein Unterschied der Expressionshöhe von ICAM-2 für WT. und I1-/I2+ gefunden werden konnte. Bedenkt man allerdings, dass ICAM-2 vor allem auf der apikalen Zelloberfläche und im Bereich der interzellularen Kontakte exprimiert wird (Thompson, Randi & Ridley, 2002), wäre denkbar, dass eine insgesamt leicht verringerte ICAM-2-Expression noch zur normalen Ausstattung der apikalen Zellmembran ausreicht (ELISA unverändert), bei der Betrachtung der gesamten Zelloberfläche in der FACS-Analyse jedoch zu Tage tritt. Durch die in jedem Fall beobachtete deutliche Adhäsionssteigerung an I1-/I2+ besteht aufgrund der zuvor erläuterten fraglichen Expressionsstärke des Moleküls auf dem retransfizierten Endothelium jedoch lediglich Ungewissheit über die Höhe, nicht aber über die grundsätzliche Bedeutung des ICAM-2-Beitrages für die Adhäsion der dendritischen Zellen am Endothel.

Ein möglicher Beitrag von ICAM-1 konnte im Rahmen derselben Experimente aufgrund der oben beschriebenen, schwankenden Adhäsionsrate von 38,5 bis 112,7% an allein ICAM-1-defizientem Endothelium (I1-/I2+) im Vergleich zum Wildtyp-Endothelium weder gesichert noch widerlegt werden. Um die Rolle von ICAM-1 weiter zu untersuchen, wurden Experimente mit immobilisiertem ICAM-1-Fc-Fusionsprotein durchgeführt. Hier fand sich für die unreifen dendritischen Zellen keine gegenüber der Hintergrundbindung an humanes IgG<sub>1</sub> erhöhte Adhäsion, während Kontrollzellen der myeloiden Mauszelllinie 32Dcl3 in deutlicher Weise ICAM-1-abhängig adhärten. Gleichzeitig konnten für beide Zelltypen ähnlich starke Bindung an P-Selektin-Fc-Fusionsprotein demonstriert werden, wie sie schon von Pendl et al. in einer vorangegangenen Studie gefunden wurden.

Obgleich die Interaktionspartner für ICAM-1 und ICAM-2 auf den dendritischen Zellen im Rahmen der Adhäsionsexperimente nicht näher eingegrenzt wurden, soll hier dennoch kurz auf mögliche Liganden eingegangen werden:

Nachdem zunächst ICAM-1 als endothelialer und leukozytärer Ligand für die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1, Mac-1 und p150.95 erkannt werden konnte, wurde kurz danach ICAM-2 als weiterer Ligand für LFA-1 entdeckt (Staunton *et al.*, 1989). In darauf folgenden Jahren konnten mit dem  $\beta_2$ -Integrin Mac-1 (Mensch und Maus) und dem neuartigen C-Typ-Lektin DC-SIGN (Mensch) zwei weitere Bindungspartner für ICAM-2 identifiziert werden (Geijtenbeek *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1995).

Die in den vorgestellten Adhäsionsexperimenten beobachtete ICAM-2-Abhängigkeit bei gleichzeitig nicht sicher beurteilbarer Bedeutung von ICAM-1 ist aus folgenden Gründen überraschend:

Trotz struktureller Unterschiede zwischen ICAM-1 und ICAM-2 wurde dennoch in der Regel eine funktionelle Interaktion des LFA-1 mit beiden ICAM beobachtet. In früheren Studien mit Neutrophilen und Lymphozyten erwies sich die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 oft als bedeutender als die an ICAM-2 (Lyck *et al.*, 2003). Obwohl die genannten  $\beta_2$ -Integrine sowohl auf den unreifen dendritischen Zellen als auch auf der Kontrollzelllinie 32Dcl3 nachgewiesen wurden, gingen nur letztgenannte Zellen eine Bindung mit immobilisiertem ICAM-1Fc-Fusionsprotein ein. Dies kann entweder auf eine unterschiedliche Präsentation der Integrine auf der Oberfläche der verschiedenen Zelltypen oder auf einen inaktiven Konformationszustand der Moleküle zurückgeführt werden, in dem eine effiziente ICAM-Bindung ausbleibt (Clark & Brugge, 1995; Springer, 1994). Auf humanen dendritischen Zellen wurde beispielsweise die konzentrierte Expression der  $\beta_2$ -Integrine auf bestimmten Zellausläufern, den sogenannten Podosomen, beobachtet, die jedoch nur zu bestimmten Reife- und Differenzierungsstadien von den Zellen gebildet werden (Burns *et al.*, 2004). Nimmt man dagegen aufgrund der fehlenden ICAM-1-Bindung eine inaktive Konformation der  $\beta_2$ -Integrine auf den dendritischen Zellen an, wird nicht nur ihre funktionelle Bedeutung in Frage gestellt, sondern auch die Gegenwart eines anderen, ICAM-2-spezifischen Interaktionspartners vorausgesetzt, der für

die beobachtete ICAM-2-vermittelte Adhäsion der Zellen am Endothel verantwortlich gemacht werden kann. Ob, wie im humanen System, DC-SIGN oder ein DC-SIGN-verwandtes Molekül auch in der Maus diese Rolle übernimmt, ist fraglich, da homologe Moleküle der Maus auf dendritischen Zellen bisher nicht nachgewiesen werden konnten (vgl. nächster Abschnitt und Geijtenbeek *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003; AG Vestweber, I. Helmus und M. Wild, nicht veröffentlichte Daten).

### 5.3.2 Transmigrationsexperimente

Nach vorangegangenen Studien zur Bedeutung von E- und P-Selektin (Pendl *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 1999) sowie von  $\beta_2$ -Integrinen (Grabbe *et al.*, 2002) konnte in der vorliegenden Arbeit eine bedeutende Rolle für endotheliales ICAM-2 bei der transendothelialen Migration unreifer muriner dendritischer Zellen identifiziert werden. Da die unreifen dendritischen Zellen  $\beta_2$ -Integrine auf ihrer Oberfläche exprimierten, sollte deren Beitrag zur ICAM-2-vermittelten Transmigration durch gezielte funktionelle Blockade mit dem monoklonalen anti-CD18-Antikörper GAME-46 überprüft werden. Diese Blockade zeigte keinen Einfluss auf die Transmigrationsfähigkeit der dendritischen Zellen. Außerdem konnte die demnach anzunehmende fehlende funktionelle Bedeutung der  $\beta_2$ -Integrine bei der ICAM-2-Bindung durch den Einsatz CD18-defizienter, aus transgenen CD18-knockout Mäusen gewonnener dendritischer Zellen bestätigt werden: Die ICAM-2-vermittelte Transmigration blieb auch bei gänzlichem Fehlen der  $\beta_2$ -Integrine auf den unreifen dendritischen Zellen erhalten.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen demnach eine  $\beta_2$ -Integrin-unabhängige ICAM-2-vermittelte Interaktion der unreifen murinen dendritischen Zellen mit dem Endothel, schließen aber die funktionelle Bedeutung der  $\beta_2$ -Integrine in diesem Zusammenhang nicht gänzlich aus. Beim Vergleich der Transmigration von Wildtyp- und CD18-defizienten dendritischen Zellen durch das Wildtyp-Endothelium wurde eine Reduktion der Transmigration um ca.  $23 \pm 8\%$  beim Fehlen der  $\beta_2$ -Kette beobachtet (Kap. 4.3.3). Gleichzeitig zeigte der funktionell blockierende anti-CD18-Antikörper GAME-46 keinen Effekt, obwohl die

Funktionalität des verwendeten Antikörpers außer Frage stand: In vorangegangenen Studien konnte er die  $\beta_2$ -Integrin-vermittelte Adhäsion stimulierter T-Lymphozyten an humanes ICAM-2 inhibieren (Driessens *et al.*, 1996). Auch in vivo wurde durch den Einsatz von GAME-46 sowohl die Chemokin-induzierte Bindung muriner Leukozyten an Cremaster-Gefäßendothel blockiert (Foy & Ley, 2000), wie auch die Akkumulation von Neutrophilen in der Lunge (Ridger *et al.*, 2001) oder im Herzmuskel von Mäusen inhibiert (Jones *et al.*, 1999). Zusammengenommen lassen die Ergebnisse daher vermuten, dass der Beitrag der  $\beta_2$ -Integrine von eher untergeordneter Bedeutung ist. Als möglicher Ligand käme für die Transmigration an erster Stelle ICAM-1 in Frage, da sowohl das Fehlen von ICAM-1 auf der endothelialen Seite, wie auch das Fehlen der  $\beta_2$ -Integrine auf der Seite der dendritischen Zellen jeweils zu der gleichen, gegenüber Wildtyp-Zellen leicht verringerten Transmigration führte (Kap. 4.3.5). Endgültige Aussagen über die Rolle des ICAM-1 sind aber erst nach ICAM-1-spezifischen zukünftigen Untersuchungen möglich. Die Annahme der geringen funktionellen Bedeutung der  $\beta_2$ -Integrine wird durch Beobachtungen von Grabbe *et al.* unterstützt, wonach die Auswanderung  $\beta_2$ -Integrin-defizienter unreifer dendritischer Zellen in die Haut gegenüber Wildtyp-Zellen nicht vermindert wurde (Grabbe *et al.*, 2002). Demgegenüber kam in zahlreichen anderen Studien mit mehr oder weniger verwandten Zelltypen wie Monozyten, Lymphozyten oder Neutrophilen der Interaktion der  $\beta_2$ -Integrine mit ICAM-1 und ICAM-2 eine entscheidende funktionelle Bedeutung bei der leukozytären Adhäsion und Transmigration zu (Issekutz *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 1990). ICAM-2 ist demnach der Primäre Ligand für LFA-1 auf unstimuliertem Endothel (de Fougerolles & Springer, 1992). Kürzlich konnte beispielsweise für murine T-Lymphozyten eine v.a. ICAM-1, zu geringerem Anteil aber auch ICAM-2-vermittelte Transmigration durch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Endotheliome beobachtet werden (Lyck *et al.*, 2003). In vivo scheinen sich darüber hinaus die LFA-1-vermittelten Funktionen von ICAM-1 und ICAM-2 zu ergänzen, da oft nur die gleichzeitige Blockade beider Moleküle zu einer reduzierten Lymphozytenmigration führt (Lehmann *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 1996).



Weiterhin zeigt auch das Adhäsions- und Transmigrationsverhalten von Monozyten eine Abhängigkeit von den genannten Molekülen: Übereinstimmend fanden verschiedene Gruppen unabhängig voneinander bedeutende Beiträge für die Interaktion der  $\beta_2$ -Integrine mit ICAM-1 und ICAM-2 einerseits, sowie für VLA-4 und VCAM-1 andererseits (Beekhuizen *et al.*, 1997; Shang & Issekutz, 1998). Darüber hinaus wurde bei Untersuchungen mit  $\beta_2$ -Integrin-defizienten Mäusen eine nur partielle Reduktion der Zahl von Monozyten und dendritischen Zellen im Lungengewebe detektiert, was die Autoren ebenfalls zur Annahme alternativer,  $\beta_2$ -Integrin-unabhängiger molekularer Mechanismen veranlasste (Schneeberger *et al.*, 2000).

Für dendritische Zellen liegen bisher die meisten Daten für humane Zellen vor. Auch hier kommt ICAM-1 und ICAM-2 besondere Bedeutung zu, obgleich die Ergebnisse in Bezug auf die beteiligten ICAM-Liganden auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen: D'Amico *et al.* konnten die Adhäsion humaner dendritischer Zellen, die aus CD14-positiven Monozyten mit Hilfe von GM-CSF und IL-13 differenziert wurden, an HUVEC durch die Kombination funktioneller anti-VLA-4- und anti- $\beta_2$ -Antikörper um 70% reduzieren. Die Blockade der  $\beta_2$ -Integrine allein reduzierte Adhäsion und Transmigration um ca. 50%. Ähnliche Ergebnisse wurden mit frisch aus dem Blut isolierten dendritischen Zellen von Brown *et al.* erzielt, während Nguyen *et al.* zwar eine LFA-1- und Mac-1-abhängige Bindung der dendritischen Zellen beobachteten, VLA-4 aber unbedeutend erschien. Demgegenüber wurden durch Geijtenbeek *et al.*  $\beta_2$ -Integrin-unabhängige ICAM-2-Beiträge zur endothelialen Adhäsion und Transmigration dendritischer Zellen gefunden, die durch DC-SIGN vermittelt wurden (Geijtenbeek *et al.*, 2000a). Der Schlüssel zum Verständnis dieser voneinander abweichenden Ergebnisse liegt möglicherweise darin, dass die verschiedenen Studien unterschiedliche Zellpopulationen gleichlautend als dendritische Zellen bezeichnen: Entweder unterscheidet sich bereits die Art der Gewinnung der dendritischen Zellen oder die Zellpopulationen werden durch Depletion für bestimmte Oberflächenmoleküle nachträglich selektiert (vgl. Kap. 2.1.2.3 und 5.1). Weiterhin unterscheiden sich die Populationen durch ihren jeweiligen Differenzierungsgrad, der, wie bereits beschrieben, von

entscheidender Bedeutung für die Migrationseigenschaften dendritischer Zellen ist. Auch Burns et al. beschreiben in ihrer kürzlich publizierten Arbeit, dass dendritische Zellen zwar die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1, Mac-1 und p150.95 auf ihrer Oberfläche tragen, die Migration der Zellen jedoch nur bei besonderer Exposition auf Zellausläufer vermitteln, welche phasenweise während der Differenzierung ausgebildet werden (Burns *et al.*, 2004). Neben den bereits erwähnten wurden zahlreiche weitere, für die leukozytäre Adhäsion und Migration bedeutende Moleküle entdeckt, von denen hier mit PECAM-1, JAM-2 und CD44 nur einige exemplarisch herausgegriffen werden können.

Zusammengenommen ist also davon auszugehen, dass eine Vielzahl unterschiedlicher molekularer Interaktionspartner zwischen Leukozyten und Endothelzellen existiert, die sich funktionell ersetzen oder ergänzen können, möglicherweise aber auch eine gewebe- und zellartspezifische Rekrutierung verschiedener Leukozyten-Subtypen erlauben.

Alternativ zu bisher besprochenen direkten molekularen Adhäsionsreaktionen soll hier die Möglichkeit angesprochen werden, dass ICAM-2 seine Funktion gerade nicht über die direkte Interaktion mit einem bekannten molekularen Adhäsionspartner ausübt, sondern vielmehr über eine indirekte, zellaktivierende Wirkung die Adhäsion und Transmigration der Zellen verstärkt (vgl. Kap. 2.4). Entsprechende Vermutungen werden durch Beobachtungen unterstützt, bei denen die Gegenwart von ICAM-2 die Adhäsion von Lymphozyten an verschiedene andere Integrinliganden begünstigte (Kotovuori *et al.*, 1999). Außerdem bewirkte die Inkubation natürlicher Killerzellen mit einem Peptid der ersten Ig-Domäne des ICAM-2 eine 2-fach gesteigerte Transmigration natürlicher Killerzellen durch einen Endothelzellrasen *in vitro* (Somersalo *et al.*, 1995). Im vorliegenden Fall könnte so die Transmigration der CD18-defizienten und der normalen dendritischen Zellen in Gegenwart von endotheliale ICAM-2 indirekt durch aktivierte nicht- $\beta_2$ -Integrine vermittelt werden. Ein mögliches Integrin-Liganden-Paar bilden in diesem Zusammenhang VLA-4 und VCAM-1, für die ein Beitrag zur leukozytären Adhäsion und Transmigration bereits vielfach gefunden werden konnte (Beekhuizen *et al.*, 1997; Bowden *et al.*, 2002;

Shang & Issekutz, 1998). Ob diese Moleküle oder noch nicht identifizierte murine ICAM-2-Liganden die  $\beta_2$ -Integrin-unabhängige Transmigration der dendritischen Zellen vermitteln, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Im humanen System wurde mit DC-SIGN ein solcher 'nicht-Integrin-Ligand' bereits entdeckt. DC-SIGN, ein Typ-II-Transmembranprotein mit einer N-terminalen Lektin-Bindungsdomäne, wurde 1992 zunächst als HIV-1-gp120-Rezeptor entdeckt (Curtis *et al.*, 1992). Im Jahr 2000 wurde von Geijtenbeek *et al.* seine auf dendritische Zellen beschränkte Expression und  $\beta_2$ -Integrin-unabhängige Interaktion mit ICAM-3 bei der Stimulation naiver T-Lymphozyten beschrieben (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Im Anschluss daran wurde von derselben Arbeitsgruppe die herausragende Rolle von DC-SIGN bei der ICAM-2-abhängigen Adhäsion und transendothelialen Migration humaner dendritischer Zellen entdeckt (Geijtenbeek *et al.*, 2000a):

Hierbei war die Adhäsion der Zellen an immobilisiertes ICAM-2 gänzlich unabhängig von dem bisher bekannten primären ICAM-2-Liganden LFA-1, selbst wenn dieser in aktivierter Konformation vorlag. An ICAM-1 wurde keine spezifische Bindung der DC-SIGN-positiven Zellen beobachtet. Demgegenüber adhärten sie DC-SIGN-vermittelt an unstimuliertem Endothel, während  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine erst bei Inkubationszeiten von  $\geq 30$  min oder nach TNF- $\alpha$ -Stimulation des Endothels eine Rolle spielten. Darüber hinaus konnte für die dendritischen Zellen ein DC-SIGN-spezifischer, nicht aber ein  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrin-spezifischer Beitrag zur transendothelialen Migration durch ruhendes Endothel identifiziert werden. Auch hier spielten die Integrine erst nach Aktivierung eine Rolle. Relativierend muss dabei angemerkt werden, dass die in der zitierten Studie verwendeten dendritischen Zellen aufgrund ihrer DC-SIGN-Expression positiv selektioniert wurden, aber nur 0,04% der gesamten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMN-cells) ausmachten. Von anderen Autoren werden jedoch 0,1% bis 1,0% der PBMN-Zellen als dendritische Zellen bezeichnet (Fearnley *et al.*, 1999; Hart, 1997), so dass möglicherweise nur ein Teil der gesamten dendritischen Zellen des Blutes positiv für DC-SIGN ist. Die in der Folgezeit von einer anderen Arbeitsgruppe beschriebene weite Verbreitung DC-SIGN-positiver Zellen dendritischen Phänotyps in menschlichen

Schleimhäuten unterstützt jedoch die Vermutung, dass das Molekül von einer funktionell bedeutenden Population dendritischer Zellen exprimiert wird (Soilleux *et al.*, 2002).

Durch Klonierungsexperimente mit anderen Spezies fand man für Primaten (Rhesus und Pigtailed Macaque) Moleküle mit hoher Homologie zu humanem DC-SIGN, während bei einem zunächst identifizierten murinen Homologen nur die Lektin-Domäne und die cytoplasmatische Domäne signifikante Ähnlichkeit aufwiesen (Baribaud *et al.*, 2001). Bei Verwendung von murinen Milzzellen konnten insgesamt fünf Homologe, m-DC-SIGN und m-SIGN-R1 bis -R4 (murine-SIGN-related-1 bis -4), identifiziert werden, von denen jedoch nur m-DC-SIGN deutlich nachweisbar in der murinen Milz exprimiert wurde (Park *et al.*, 2001). In weiterführenden Arbeiten anderer und der eigenen Arbeitsgruppe konnte jedoch keines der genannten Homologen auf dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Geijtenbeek *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003; AG Vestweber, I. Helmus und M. Wild, nicht veröffentlichte Daten). Insbesondere die in dieser Arbeit eingesetzten, aus murinem Knochenmark differenzierten dendritischen Zellen exprimieren nach Erkenntnissen von I. Helmus und M. Wild kein m-DC-SIGN oder eines seiner Homologen (unveröffentlicht). Demnach ist der hier vorgestellte ICAM-2-vermittelte Adhäsions- und Transmigrationsbeitrag nicht auf murine DC-SIGN-Homologe sondern einen genetisch andersartigen 'nicht-Integrin'-Bindungspartners für ICAM-2 zurückzuführen.

Murine dendritische Zellen wurden bisher nur in den bereits zitierten Studien von Pendl *et al.*, Lappin *et al.*, Robert *et al.* und Grabbe *et al.* in Bezug auf die für ihr Transmigrationsverhalten verantwortlichen Adhäsionsmoleküle untersucht. In Ergänzung zu der darin beschriebenen Rolle für E- und P-Selektin sowie der fehlenden Bedeutung der  $\beta_2$ -Integrine liefert die hier vorgelegte Arbeit Belege für einen wichtigen Beitrag des ICAM-2 für die endotheliale Adhäsion und Transmigration unreifer dendritischer Zellen. Im Rahmen zukünftiger Studien muss der Mechanismus dieses neuartigen Adhäsionsweges näher untersucht werden. Durch die hier vorgestellte Interaktion dendritischer Zellen

mit endothelialelem ICAM-2 konnte eine weitere Facette des komplexen Zusammenspiels der verschiedenen Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Extravasation der Leukozyten verstanden und ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für ein immunregulatives therapeutisches Eingreifen gefunden werden.

## 6 Abkürzungen

32Dcl3	Myeloide Maus-Zelllinie (ATCC, Rockville, Maryland, USA)
APC	antigen present cell
Asp	Aspartat
$\alpha_D\beta_2$	CD11d/CD18
$\alpha_L\beta_2$ , LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1, CD11a/CD18
$\alpha_M\beta_2$ , Mac-1	macrophage-differentiation-antigen-1, CD11b/CD18
$\alpha_X\beta_2$ , p150,95	CD11c/CD18
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CHO-Zellen	Chinese hamster ovary-cells
COS-Zellen	Affen-Zelllinie, Zellen von <i>Cercopithecus aethiops</i> wurden mit SV40 transformiert (Origin-defective mutant of SV40)
DC	dendritic cell
DC-SIGN	dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth-factor
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
Fa.	Firma
Fab	fragment antigen binding
FACS	fluorescence-activated cell sorter
Fc	fragment crystallizable
FCS	fetal calf serum
fl	Femtoliter
GFFKR-motif	Glycin-Phenylalanin-Phenylalanin-Lysin-Arginin-Motiv
Glu	Glutamat
GlyCAM-1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
h	Stunde
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEV	high endothelial venule
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
I1-/I2-.bEnd	bEndI1/2.1 RL (Lyck <i>et al.</i> , 2003)
I1-/I2+.bEnd	bEndI1/2.1-I2 B1* (Lyck <i>et al.</i> , 2003)
ICAM	intercellular adhesion molecule
I-domain	inserted domain
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
JAM	junctional adhesion molecule
kD	Kilodalton (Molekulargewichtseinheit)
LAD I	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndrom I
LPAM-1	lymphocyte Peyers-patch adhesion molecule-1, $\alpha_4\beta_7$

LPS	Lipopolysaccharid
µm	Mikrometer
M	molar
MadCAM-1	mucosal-addressin cell adhesion molecule-1
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
mfi	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
MIDAS	metal ion-dependent adhesion site
min	Minute
MIP	macrophage inflammatory protein
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenyldiamin-Dihydrochlorid
PBMN-cells	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PECAM-1	platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RANTES	regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
MCP-3	monocyte chemoattractant protein-3
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCR	short consensus repeat
SDF-1	stromal-cell derived factor-1
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIGN-R	SIGN-related
SLC	secondary lymphoid chemokine
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VE-Cadherin	vascular endothelial-cell-specific cadherin
VLA-4	very late antigen-4, α4β1
WT.bEnd	bEnd5 (Bussolino <i>et al.</i> , 1991)

## 7 Literaturverzeichnis

- Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E. & Springer, T. A. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* 128, 1243-1253.
- Anderson, D. C. & Springer, T. A. (1987). Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in Mac-1, LFA-1, and p150/95 glycoprotein. *Ann. Rev. Med.* 38, 175-192.
- Andrian, U. H. & Mackay, I. (2000). T-cell function und migration. *N Engl J Med* 343, 1020-1034.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L. & Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-3.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Baribaud, F., Pohlmann, S., Sparwasser, T., Kimata, M. T., Choi, Y. K., Haggarty, B. S., Ahmad, N., Macfarlan, T., Edwards, T. G., Leslie, G. J., Arnason, J., Reinhart, T. A., Kimata, J. T., Littman, D. R., Hoxie, J. A. & Doms, R. W. (2001). Functional and antigenic characterization of human, rhesus macaque, pigtailed macaque, and murine DC-SIGN. *J. Virol.* 75, 10281-10289.
- Beekhuizen, H., van de Gevel, J., Olsson, B., van Benten, I. & van Furth, R. (1997). Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes. *J Immunol* 158, 774-782.
- Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Berg, E. L., Erlandsen, S. L. & Butcher, E. C. (1995).  $\alpha 4$  integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80, 413-422.
- Bevilacqua, M. P. & Nelson, R. M. (1993). Selectins. *J. Clin. Invest.* 91, 379-387.
- Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S. & Gimbrone, M. A., Jr. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9238-9242.
- Bianchi, G., D'Amico, G., Varone, L., Sozzani, S., Mantovani, A. & Allavena, P. (2000). In vitro studies on the trafficking of dendritic cells through endothelial cells and extra-cellular matrix. *Dev Immunol.* 7, 143-53.
- Bixel, G., Kloep, S., Butz, S., Petri, B., Engelhardt, B. & Vestweber, D. (2004). Mouse CD99 participates in T cell recruitment into inflamed skin. *Blood*, 2004-03-1184.
- Bleijs, D. A., de Waal-Malefyt, R., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y. (1999). Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF-alpha cytokine



- profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur J Immunol* 29, 2248-58.
- Bouis, D., Hospers, G. A., Meijer, C., Molema, G. & Mulder, N. H. (2001). Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4, 91-102.
- Bowden, R. A., Ding, Z.-M., Donnachie, E. M., Petersen, T. K., Michael, L. H., Ballantyne, C. M. & Burns, A. R. (2002). Role of  $\alpha$ 4 Integrin and VCAM-1 in CD18-Independent Neutrophil Migration Across Mouse Cardiac Endothelium. *Circ Res* 90, 562-569.
- Brown, K. A., Bedford, P., Macey, M., McCarthy, D. A., Leroy, F., Vora, A. J., Stagg, A. J., Dumonde, D. C. & Knight, S. C. (1997). Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin Exp Immunol* 107, 601-7.
- Burns, A. R., Walker, D. C., Brown, E. S., Thurmon, L. T., Bowden, R. A., Keese, C. R., Simon, S. I., Entman, M. L. & Smith, C. W. (1997). Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J. Immunol.* 159, 2893-2903.
- Burns, S., Hardy, S. J., Buddle, J., Yong, K. L., Jones, G. E. & Thrasher, A. J. (2004). Maturation of DC Is Associated With Changes in Motile Characteristics and Adherence. *Cell Motil Cytoskel* 57, 118-132.
- Bussolino, F., De Rossi, M., Sica, A., Colotta, F., Wang, J. M., Bocchietto, E., Padura, I. M., Bosia, A., DeJana, E. & Mantovani, A. (1991). Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. *J. Immunol.* 147, 2122-2129.
- Butcher, E. C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.
- Carpenito, C., Pyszniak, A. M. & Takei, F. (1997). ICAM-2 provides a costimulatory signal for T cell stimulation by allogeneic class II MHC. *Scand J Immunol* 45, 248-54.
- Casasnovas, J. M., Pieroni, C. & Springer, T. A. (1999). Lymphocyte function-associated antigen-1 binding residues in intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) and the integrin binding surface in the ICAM subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3017-22.
- Casasnovas, J. M., Springer, T. A., Liu, J. H., Harrison, S. C. & Wang, J. H. (1997). Crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface. *Nature* 387, 312-5.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M. & Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561.

- Clark, E. A. & Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.
- Crockett-Torabi, E. (1998). Selectins and mechanisms of signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 63, 1-14.
- Cunningham, S. A., Rodriguez, J. M., Arrate, M. P., Tran, T. M. & Brock, T. A. (2002). JAM2 Interacts with alpha 4beta 1. FACILITATION BY JAM3. *J. Biol. Chem.* 277, 27589-27592.
- Curtis, B., Scharnowski, S. & Watson, A. (1992). Sequence and Expression of a Membrane-Associated C-Type Lectin that Exhibits CD4-Independent Binding of Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein gp120. *PNAS* 89, 8356-8360.
- D'Amico, G., Bianchi, G., Bernasconi, S., Bersani, L., Piemonti, L., Sozzani, S., Mantovani, A. & Allavena, P. (1998). Adhesion, Transendothelial Migration, and Reverse Transmigration of In Vitro Cultured Dendritic Cells. *Blood* 92, 207-214.
- Damle, N. K., Klussman, K. & Aruffo, A. (1992). Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T cells. *J Immunol* 148, 665-71.
- de Fougères, A. & Springer, T. (1992). Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175, 185-190.
- de Fougères, A. R., Stacker, S. A., Schwarting, R. & Springer, T. A. (1991). Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174, 253-267.
- de la Rosa, G., Longo, N., Rodriguez-Fernandez, J. L., Puig-Kroger, A., Pineda, A., Corbi, A. L. & Sanchez-Mateos, P. (2003). Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J Leukoc Biol* 73, 639-649.
- del Hoyo, G. M., Martin, P., Vargas, H. H., Ruiz, S., Arias, C. F. & Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 415, 1043-7.
- Dosquet, C., Weill, D. & Wautier, J. L. (1992). Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Fr Hematol* 34, S55-9.
- Driessens, M. H., van Hulten, P., Zuurbier, A., La Riviere, G. & Roos, E. (1996). Inhibition and stimulation of LFA-1 and Mac-1 functions by antibodies against murine CD18. Evidence that the LFA-1 binding sites for ICAM-1, -2, and -3 are distinct. *J Leukoc Biol* 60, 758-65.
- Duncan, G. S., Andrew, D. P., Takimoto, H., Kaufman, S. A., Yoshida, H., Spellberg, J., de la Pompa, J. L., Elia, A., Wakeham, A., Karan-Tamir, B., Muller, W. A., Senaldi, G., Zukowski, M. M. & Mak, T. W. (1999).

- Genetic evidence for functional redundancy of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J. Immunol.* 162, 3022-3030.
- Dustin, M. & Springer, T. (1999). Intercellular adhesion molecules (ICAMs). In *Extracellular matrix, anchor and adhesion proteins* (ed. T. Kreis and R. Vale), pp. 216-220. Oxford University Press, New York.
- Dustin, M. L. & Springer, T. A. (1988). Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* 107, 321-331.
- Edgell, C. J., McDonald, C. C. & Graham, J. B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3734-3737.
- Edwards, C. P., Fisher, K. L., Presta, L. G. & Bodary, S. C. (1998). Mapping the intercellular adhesion molecule-1 and -2 binding site on the inserted domain of leukocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 273, 28937-44.
- Erickson, K., Blanchard, M., Dimolfetto, L., Lepper, H., Wang, J., Stott, J. L. & Ferrick, D. A. (1998). Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunology* 94, 207-12.
- Fearnley, D. B., Whyte, L. F., Carnoutsos, S. A., Cook, A. H. & Hart, D. N. J. (1999). Monitoring Human Blood Dendritic Cell Numbers in Normal Individuals and in Stem Cell Transplantation. *Blood* 93, 728-736.
- Feng, D., Nagy, J. A., Pyne, K., Dvorak, H. F. & A.M., D. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med.* 187, 903-915.
- Feng, Z. H., Wang, Q. C., Nie, Q. H., Jia, Z. S. & Zhou, Y. X. (2004). DC-SIGN: binding receptor for HCV? *World Journal of Gastroenterology* 10, 925-9.
- Ferrero, E., Bondanza, A., Leone, B. E., Manici, S., Poggi, A. & Zocchi, M. R. (1998). CD14+CD34+ Peripheral Blood Mononuclear Cells Migrate Across Endothelium and Give Rise to Immunostimulatory Dendritic Cells. *J Immunol* 160, 2675-2683.
- Fields, R. C., Osterholzer, J. J., Fuller, J. A., Thomas, E. K., Geraghty, P. J. & Mule, J. J. (1998). Comparative analysis of murine dendritic cells derived from spleen and bone marrow. *J Immunother* 21, 323-39.
- Fleming, T. J., Fleming, M. L. & Malek, T. R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151, 2399-408.

- Foy, D. S. & Ley, K. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 is required for chemoattractant- induced leukocyte adhesion in resting, but not inflamed, venules in vivo. *Microvasc Res* 60, 249-60.
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol* 1, 353-357.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. & Figdor, C. G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.
- Geijtenbeek, T. B. H., Groot, P. C., Nolte, M. A., van Vliet, S. J., Gangaram-Panday, S. T., van Duijnhoven, G. C. F., Kraal, G., van Oosterhout, A. J. M. & van Kooyk, Y. (2002). Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 100, 2908-2916.
- Geng, J.-G., Bevilacqua, M. P., Moore, K. L., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Kim, J. M., Bliss, G. A., Zimmerman, G. A. & McEver, R. P. (1990). Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343, 757-760.
- Gerwin, N., Gonzalo, J. A., Lloyd, C., Coyle, A. J., Reiss, Y., Banu, N., Wang, B., Xu, H., Avraham, H., Engelhardt, B., Springer, T. A. & Gutierrez-Ramos, J. C. (1999). Prolonged eosinophil accumulation in allergic lung interstitium of ICAM- 2 deficient mice results in extended hyperresponsiveness. *Immunity* 10, 9-19.
- Gibson, R. M., Kansas, G. S., Tedder, T. F., Furie, B. & Furie, B. C. (1995). Lectin and epidermal growth factor domains of P-selectin at physiologic density are the recognition unit for leukocyte binding. *Blood* 85, 151-158.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1976). Culture of vascular endothelium. *Progress in Hemostasis & Thrombosis* 3, 1-28.
- Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R., Böggemeyer, E., Simon, M., Mossmann, H. & Vestweber, D. (1997). VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* 110, 583-588.
- Grabbe, S., Varga, G., Beissert, S., Steinert, M., Pendl, G., Seeliger, S., Bloch, W., Peters, T., Schwarz, T., Sunderkotter, C. & Scharffetter-Kochanek, K. (2002).  $\beta_2$  integrins are required for skin homing of primed T cells but not for priming naive T cells. *J. Clin. Invest.* 109, 183-192.
- Hahne, M., Lenter, M., Jäger, U., Isenmann, S. & Vestweber, D. (1993). VCAM-1 is not involved in LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_1/\alpha_4\beta_7$ ) mediated binding of lymphoma cells to high endothelial venules of mucosa-associated lymph nodes. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 290-298.

- Harris, E. S., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. & Zimmerman, G. A. (2000). The Leukocyte Integrins. *J. Biol. Chem.* 275, 23409-23412.
- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-87.
- Hayflick, J. S., Kilgannon, P. & Gallatin, W. M. (1998). The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res.* 17, 313-27.
- Helmer. (1999). Integrins. In *Extracellular Matrix, anchor and adhesion proteins* (ed. T. Kreis and R. Vale), pp. 196-212. Oxford University Press, New York.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E. & Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167, 741-8.
- Huang, C. & Springer, T. A. (1997a). Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3162-3167.
- Huang, C. & Springer, T. A. (1997b). Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3162-7.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- 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, 1693-702.
- Inaba, K., Swiggard, W. J., Inaba, M., Meltzer, J., Mirza, A., Sasagawa, T., Nussenzweig, M. C. & Steinman, R. M. (1995). Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell Immunol* 163, 148-56.
- Issekutz, A., Rowter, D. & Springer, T. (1999). Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol* 65, 117-126.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Capra, J. D. (1999). *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 4th edition. Elsevier Science Ltd., New York.
- Jones, S. P., Girod, W. G., Granger, D. N., Palazzo, A. J. & Lefer, D. J. (1999). Reperfusion injury is not affected by blockade of P-selectin in the diabetic mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277, H763-769.

- Kang, Y.-S., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M., Bruening, S. A., Kim, J. Y., Takahara, K., Inaba, K., Steinman, R. M. & Park, C. G. (2003). SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int. Immunol.* 15, 177-186.
- Kansas, G. S. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88, 3259-3287.
- Kotovuori, A., Pessa-Morikawa, T., Kotovuori, P., Nortamo, P. & Gahmberg, C. G. (1999). ICAM-2 and a Peptide from Its Binding Domain Are Efficient Activators of Leukocyte Adhesion and Integrin Affinity. *J Immunol* 162, 6613-6620.
- Labeur, M. S., Roters, B., Pers, B., Mehling, A., Luger, T. A., Schwarz, T. & Grabbe, S. (1999). Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J. Immunol.* 162, 168-175.
- Langerhans, P. (1868). Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virch. Arch.* 44, 325-327.
- Lappin, Weiss, Delattre, Mai, Dittmar, Maier, Manke, Grabbe, Martin & Simon. (1999). Analysis of mouse dendritic cell migration *in vivo* upon subcutaneous and intravenous injection. *Immunology* 98, 181-188.
- Lawrence, M., Smith, C., Eskin, S. & McIntire, L. (1990). Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood* 75, 227-237.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. & Liddington, R. (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80, 631-8.
- Lehmann, J. C. U., Jablonski-Westrich, D., Haubold, U., Gutierrez-Ramos, J.-C., Springer, T. & Hamann, A. (2003). Overlapping and Selective Roles of Endothelial Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in Lymphocyte Trafficking. *J Immunol* 171, 2588-2593.
- Ley, K. (1999). . In *Vascular adhesion molecules and inflammation* (ed. Pearson), pp. 11. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Li, F., Wilkins, P. P., Crawley, S., Weinstein, J., Cummings, R. D. & McEver, R. P. (1996). Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J. Biol. Chem.* 271, 3255-3264.
- Li, R., Nortamo, P., Valmu, L., Tolvanen, M., Huuskonen, J., Kantor, C. & Gahmberg, C. G. (1993). A peptide from ICAM-2 binds to the leukocyte integrin CD11a/CD18 and inhibits endothelial cell adhesion. *J Biol Chem* 268, 17513-8.
- Li, R., Xie, J., Kantor, C., Koistinen, V., Altieri, D. C., Nortamo, P. & Gahmberg, C. G. (1995). A peptide derived from the intercellular

- adhesion molecule-2 regulates the avidity of the leukocyte integrins CD11b/CD18 and CD11c/CD18. *J Cell Biol* 129, 1143-53.
- Lin, C. L., M, S. R., Richard, A. R., Austyn, J. M. & Roake, J. A. (1998). Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol.* 28, 4114-22.
- Lobb, R. R. & Hemler, M. E. (1994). The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J. Clin. Invest.* 94, 1722-8.
- Luster, A. D., MacLean J. (2000). Chemokines and chemokine receptors. In *Transmigration of Leukocytes* (ed. K. F. Ley), pp. 90-110. Oxford University Press, New York.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77-92.
- Lyck, R., Reiss, Y., Gerwin, N., Greenwood, J., Adamson, P. & Engelhardt, B. (2003). T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells. *Blood* 102, 3675-83.
- Mahnke, K., Becher, E., Ricciardi-Castagnoli, P., Luger, T. A., Schwarz, T. & Grabbe, S. (1997). CD14 is expressed by subsets of murine dendritic cells and upregulated by lipopolysaccharide. *Adv Exp Med Biol* 417, 145-59.
- Martin, P., del Hoyo, G. M., Anjuere, F., Ruiz, S. R., Arias, C. F., Marin, A. R. & Ardavin, C. (2000). Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* 96, 2511-9.
- Masurier, C., Pioche-Durieu, C., Colombo, B. M., Lacave, R., Lemoine, F. M., Klatzmann, D. & Guigon, M. (1999). Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology* 96, 569-77.
- Mayordomo, J., Zorina, T., Storkus, W., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L., Melief, C., Ildstad, S., Kast, W., Deleo, A. & al., e. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med.* 1, 1297-302.
- McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L. & Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84, 92-99.

- McLaughlin, F., Hayes, B. P., Horgan, C. M., Beesley, J. E., Campbell, C. J. & Randi, A. M. (1998). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-1beta down-regulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 expression on the endothelium. *Cell Adhes Commun* 6, 381-400.
- Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X. & Phillips, D. M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178, 449-460.
- Muller, W. A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology* 24, 326-333.
- Murphy, P. M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 593-633.
- Nguyen, V. A., Ebner S., Furhapter C., Romani N., Kolle D., Fritsch P., Sepp N. (2002). Adhesion of dendritic cells derived from CD34+ progenitors to resting human dermal microvascular endothelial cells is down-regulated upon maturation and partially depends on CD11a-CD18, CD11b-CD18 and CD36. *Eur J Immunol* 32, 3638-50.
- Norman, K. E., Moore, K. L., McEver, R. P. & Ley, K. (1995). Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 86, 4417-4421.
- Nortamo, P., Li, R., Renkonen, R., Timonen, T., Prieto, J., Patarroyo, M. & Gahmberg, C. G. (1991). The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* 21, 2629-32.
- Olson, T. S. & Ley, K. (2002). Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R7-28.
- Park, C. G., Takahara, K., Umemoto, E., Yashima, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Clausen, B. E., Inaba, K. & Steinman, R. M. (2001). Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int. Immunol.* 13, 1283-1290.
- Pendl, G. G., Robert, C., Steinert, M., Thanos, R., Eytner, R., Borges, E., Wild, M. K., Lowe, J. B., Fuhlbrigge, R. C., Kupper, T. S., Vestweber, D. & Grabbe, S. (2002). Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* 99, 946-56.
- Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F. C. A., Perez, M., Singhal, A. K., Hakomori, S. & Paulson, J. C. (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Le<sup>x</sup>. *Science* 250, 1130-1132.



- Piguet, V. & Blauvelt, A. (2002). Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J Invest Dermatol* 119, 365-9.
- Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. & Muller, W. A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-61.
- Reiss, Y. & Engelhardt, B. (1999). T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int Immunol* 11, 1527-39.
- Ridger, V. C., Wagner, B. E., Wallace, W. A. & Hellewell, P. G. (2001). Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *J Immunol* 166, 3484-90.
- Robert, C., Fuhlbrigge, R. C., Kieffer, J. D., Ayehunie, S., Hynes, R. O., Cheng, G., Grabbe, S., von Andrian, U. H. & Kupper, T. S. (1999). Interaction of dendritic cells with skin Endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J. Exp. Med.* 189, 627-635.
- 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.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-18.
- Salomon, B. & Bluestone, J. A. (1998). Cutting Edge: LFA-1 Interaction with ICAM-1 and ICAM-2 Regulates Th2 Cytokine Production. *J Immunol* 161, 5138-5142.
- Scharffetter-Kochanek, K., Lu, H., Norman, K., van Nood, N., Munoz, F., Grabbe, S., McArthur, M., Lorenzo, I., Kaplan, S., Ley, K., Smith, C. W., Rich, S., Montgomery, C. A. & Beaudet, A. L. (1998a). Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J. Exp. Med.* 188, 119-131.
- Scharffetter-Kochanek, K., Lu, H., Norman, K., van Nood, N., Munoz, F., Grabbe, S., McArthur, M., Lorenzo, I., Kaplan, S., Ley, K., Wayne Smith, C., Montgomery, C. A., Rich, S. & Beaudet, A. L. (1998b). Spontaneous Skin Ulceration and Defective T Cell Function in CD18 Null Mice. *J. Exp. Med.* 188, 119-131.
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M. & Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat.Immunol.* 3, 143-150.

- Schneeberger, E. E., Vu, Q., LeBlanc, B. W. & Doerschuk, C. M. (2000). The Accumulation of Dendritic Cells in the Lung Is Impaired in CD18-/- But Not in ICAM-1-/- Mutant Mice. *J Immunol* 164, 2472-2478.
- Schreurs, M. W., Eggert, A. A., de Boer, A. J., Figdor, C. G. & Adema, G. J. (1999). Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 2835-2841.
- Schuler, G. & Steinman, R. M. (1997). Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 186, 1183-7.
- Schwartz, B., Vicart, P., Delouis, C. & Paulin, D. (1991). Mammalian cell lines can be efficiently established in vitro upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. *Biology of the Cell* 73, 7-14.
- Shang, X. Z. & Issekutz, A. C. (1998). Contribution of CD11a/CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. *Eur. J. Immunol.* 28, 1970-1979.
- Shang, X. Z. & Issekutz, A. C. (1999). Enhancement of monocyte transendothelial migration by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: requirement for chemoattractant and CD11a/CD18 mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 29, 3571-3582.
- Shaw, S. K., Bamba, P. S., Perkins, B. N. & Luscinskas, F. W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol.* 167, 2323-2330.
- Shortman, K. (2000). Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol Cell Biol* 78, 161-5.
- Snapp, K. R., Wagers, A. J., Craig, R., Stoolman, L. M. & Kansas, G. S. (1997). P-selectin glycoprotein ligand-1 is essential for adhesion to P-selectin but not E-selectin in stably transfected hematopoietic cell lines. *Blood* 89, 896-901.
- Soilleux, E. J., Morris, L. S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L. J., Doms, R. W., Weissman, D., Coleman, N. & Lee, B. (2002). Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 71, 445-457.
- Somersalo, K., Carpen, O., Saksela, E., Gahmberg, C. G., Nortamo, P. & Timonen, T. (1995). Activation of natural killer cell migration by leukocyte integrin-binding peptide from intracellular adhesion molecule-2 (ICAM-2). *J Biol Chem* 270, 8629-36.
- Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Mantovani, A. (1999a). The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 66, 1-9.

- Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Mantovani, A. (1999b). The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 66, 1-9.
- Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Mantovani, A. (2000). Chemokines and dendritic cell traffic. *J Clin Immunol.* 20, 151-60.
- Sozzani, S., Mantovani, A. & Allavena, P. (1999c). Control of dendritic cell migration by chemokines. *Forum (Genova)* 9, 325-38.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Springer, T. A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 827-872.
- Staunton, D. E., Dustin, M. L. & Springer, T. A. (1989). Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339, 61-64.
- Steeber, D. A., Engel, P., Miller, A. S., Sheetz, M. P. & Tedder, T. F. (1997). Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J. Immunol.* 159, 952-963.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296.
- Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-62.
- Steinman, R. M. & Inaba, K. (1999). Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 66, 205-8.
- Takashima, A. & Matsue, H. (2001). Development and testing of dendritic cell lines. In *Dendritic cells* (ed. M. T. Lotze and A. W. Thomson), pp. 165-178. Academic press, London, UK.
- Takayama, T., Morelli, A. E., Onai, N., Hirao, M., Matsushima, K., Tahara, H. & Thomson, A. W. (2001). Mammalian and Viral IL-10 Enhance C-C Chemokine Receptor 5 but Down-Regulate C-C Chemokine Receptor 7 Expression by Myeloid Dendritic Cells: Impact on Chemotactic Responses and In Vivo Homing Ability. *J Immunol* 166, 7136-7143.
- Tanaka, Y., Adams, D. H. & Shaw, S. (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* 14, 111115.
- Teixido, J., Parker, C. M., Kassner, P. D. & Hemler, M. E. (1992). Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage. *J Biol Chem* 267, 1786-91.
- Thery, C. & Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13, 45-51.

- Thompson, P. W., Randi, A. M. & Ridley, A. J. (2002). Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1, But Not ICAM-2, Activates RhoA and Stimulates c-fos and rhoA Transcription in Endothelial Cells. *J Immunol* 169, 1007-1013.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. & Weissman, I. L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-4.
- Vestweber, D. & Blanks, J. E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79, 181-213.
- Wagner, E. F. & Risau, W. (1994). Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. *Semin Cancer Biol* 5, 137-45.
- Wilson, R., Ballantyne, C., Smith, C., Montgomery, C., Bradley, A., O'Brien, W. & Beaudet, A. (1993). Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J Immunol* 151, 1571-1578.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R. & Shortman, K. (1991). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 174, 1617-27.
- Xie, J., Li, R., Kotovuori, P., Vermot Desroches, C., Wijdenes, J., Arnaout, M. A., Nortamo, P. & Gahmberg, C. G. (1995). Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J. Immunol.* 155, 3619-3628.
- Xu, H., Bickford, J. K., Luther, E., Carpenito, C., Takei, F. & Springer, T. A. (1996). Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. *J. Immunol.* 156, 4909-14.
- Xu, H., Tong, I. L., De Fougères, A. R. & Springer, T. A. (1992). Isolation, characterization, and expression of mouse ICAM-2 complementary and genomic DNA. *J Immunol* 149, 2650-5.
- Yang, J. T., Rayburn, H. & Hynes, R. O. (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development (Cambridge, England)* 121, 549-560.



## 9 Danksagung

Ich danke Prof. Dietmar Vestweber für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen sowie die umfassende Unterstützung und wissenschaftliche Beratung.

Dr. Martin Wild danke ich für die großartige praktische und wissenschaftliche Betreuung, seine unermüdliche Bereitschaft, Fragen zu diskutieren sowie für unzählige wertvolle Tipps und Hilfestellungen.

Herzlicher Dank gilt Dr. Kerstin Lühn und Dr. Ines Nasdala für ihre umfangreiche Hilfe beim Erlernen neuer Methoden und beim Überwinden von allein unüberwindlichen Hürden.

Prof. Britta Engelhardt danke ich für die Bereitstellung der Endotheliome und zahlreiche hilfreiche Informationen.

Prof. Stephan Grabbe danke ich für die Überlassung der CD18-defizienten Mäuse und seine freundliche Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen.

Dr. Georg Varga danke ich für viele gute Diskussionen, praktische Hilfestellungen und die Durchsicht des Manuskripts.

Renate Thanos und Meike Steinert gilt herzlicher Dank für die Hilfe bei der Gewinnung murinen Knochenmarks.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die geduldige Unterstützung, die gute Atmosphäre und den Spass bei der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre lebenslange Unterstützung, ihre Geduld und ihr Vertrauen.

Ich danke Christine Pielken dafür, einfach immer da zu sein.