

UNTERSUCHUNG IMMUNBIOLOGISCHER EFFEKTE VON SANGLIFEHRIN A
BEI DENDRITISCHEN ZELLEN *IN VITRO* UND *IN VIVO*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig Universität
in Gießen

von
Sabrina Nadine Immecke
aus Kassel

Gießen
2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Professor Dr. M. Martin
Professor Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 17.08.2009

MEINER OMA EMMA

Inhaltsverzeichnis

1	Summary	5
2	Zusammenfassung	7
3	Einleitung	9
3.1	Angeborene und adaptive Immunabwehr	9
3.2	Dendritische Zellen	10
3.3	Einteilung Dendritischer Zellen.....	10
3.4	Reifung Dendritischer Zellen	12
3.5	Migration von Dendritischen Zellen	13
3.6	Chemokine.....	15
3.6.1	Homöostatische Chemokine	16
3.6.2	Inflammatorische Chemokine.....	17
3.7	Immunsuppressiva	18
3.7.1	Glukokortikoide	19
3.7.2	Calcineurininhibitoren, Rapamycin und Sangliferin A	19
3.8	Zielsetzung	22
4	Materialien und Methoden.....	23
4.1	Materialien.....	23
4.1.1	Immunsuppressiva.....	23
4.1.2	Zytokine.....	23
4.1.3	Antikörper.....	23
4.1.4	Fertige Reagenziensätze	24
4.1.5	Chemikalien	25
4.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	26
4.1.7	Geräte	26
4.1.8	Computersoftware	26
4.1.9	Humanes Probenmaterial.....	27

4.1.10	Tiere.....	27
4.2	Methoden.....	28
4.2.1	Zell- und Molekularbiologische Methoden	28
4.2.1.1	Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus dem <i>buffy coat</i>	28
4.2.1.2	Reinigung von CD14⁺-Zellen mit Hilfe des <i>automated magnetic activating cell sorting</i> (AutoMACS)	29
4.2.1.3	Reinigung von CD4⁺-Zellen mit Hilfe des <i>AutoMACS</i>	30
4.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer oder mit dem Sysmex KX-21N	30
4.2.1.5	Stimulation der MoDCs für die RNA-Gewinnung	31
4.2.1.6	RNA-Isolierung	31
4.2.1.7	RNA-Konzentrationsbestimmung	32
4.2.1.8	RNA-Qualitätskontrolle	33
4.2.1.9	cDNA-Oligonukleotid-Microarray	33
4.2.2	Biochemische und Immunologische Methoden.....	34
4.2.2.1	Stimulation der humanen DCs für die <i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i> (ELISAs)	34
4.2.2.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) IL-12p70, CXCL9 und CXCL10 von BD Biosciences	35
4.2.2.3	ELISA der humanen Chemokine CCL1, CCL5, CCL17 und CCL19 von R&D	35
4.2.2.4	<i>In vitro</i>-Untersuchung zur Beeinflussung der Migration von DCs	36
4.2.2.5	<i>In vitro</i>-Untersuchung der Migration von T-Lymphozyten	37
4.2.2.6	Durchflusszytometrie (FACS: <i>fluorescent activating cell sorting</i> oder <i>fluorescent activating cell scanning</i>)	37
4.2.3	Tierexperimentelle Methoden.....	40
4.2.3.1	Präparation des Inguinal-Lymphknotens aus der Maus	40
4.2.3.2	Leukozyten-Isolierung aus dem Lymphknoten der Maus	40

4.2.3.3	Messung der <i>in vivo</i> -Migration von DCs mit Hilfe der „FITC-Painting“-Methode	41
5	Ergebnisse	42
5.1	cDNA-Microarray.....	42
5.2	<i>in vitro</i> -Proteinexpressionen.....	45
5.2.1	IL-1sRII-Proteinexpression bei humanen Dendritischen Zellen	46
5.2.2	Sanglifehrin A supprimiert die CCL5-, CCL17-, CXCL9-, CXCL10- und CCL19-Produktion humaner Dendritischer Zellen auf Proteinebene	47
5.2.3	Dosisabhängigkeit der Chemokinproduktion nach SFA-Gabe.....	49
5.2.4	Die Effekte von Sanglifehrin A im Vergleich mit anderen Immunsuppressiva	50
5.2.5	Kompetition von SFA und CsA.....	52
5.2.6	Sanglifehrin A inhibiert die Migration Dendritischer Zellen zu CCL19 - CCR7-unabhängig	53
5.2.7	Sanglifehrin A inhibiert die Expression von CD38	55
5.2.8	<i>In vitro</i> -Untersuchung zur Beeinflussung der Migration von DCs.....	59
5.2.9	<i>In vitro</i> -Untersuchung zur Beeinflussung der Migration von T-Lymphozyten.....	60
5.3	SFA inhibiert die <i>in vivo</i> Migration von Dendritischen Zellen.....	62
6	Diskussion	64
6.1	Genexpressionsänderung nach Sanglifehrin A-Behandlung bei humanen Dendritischen Zellen	64
6.2	<i>In vitro</i> Proteinexpressionen.....	65
6.2.1	IL-1RII-Proteinexpression.....	65
6.2.2	Chemokin-Expressionen.....	65
6.2.3	Chemokinexpression von DCs nach SFA-, CsA-, Rapamycin- und Dexamethason-Behandlung	69
6.3	Migration Dendritischer Zellen nach SFA-Behandlung	71
6.4	SFA inhibiert die CD38-Expression bei Dendritischen Zellen	72

6.5	<i>In vitro</i> Migration Dendritischer Zellen und T-Zellen zum Überstand Sanglifehrin A-behandelter DCs.....	73
6.6	<i>In vivo</i> -Migration nach SFA-Gabe	74
6.7	Ausblick auf die Klinische Anwendung von SFA.....	75
7	Literatur	76
8	Abkürzungsverzeichnis	84
9	Anhang	86
9.1	Microarray-Daten.....	86
10	Danksagung.....	94
11	Ehrenwörtliche Erklärung.....	95

1 Summary

Sanglifehrin A (SFA) is an immunosuppressive drug. It is a representative of a class of macrolides produced by the actinomycetes strain *Streptomyces* A92-308110 that bind to cyclophilin A (CypA), the binding protein of Cyclosporine A (CsA). Although SFA has a higher affinity than CsA for cyclophilin, SFA does not inhibit the activity of calcineurin phosphatases, but SFA inhibits RAF-1 kinase phosphorylation (Sanchez-Tillo, Wojciechowska et al. 2006). Different groups have reported that SFA exerts unique suppressive effects on human and mouse dendritic cells (DC) (Steinschulte, Taner et al. 2003; Ko, Hambly et al. 2008). The mechanism of action of SFA is still unknown.

This study presents new data about the immunoregulatory function of SFA in DCs. SFA blocked the expression of 190 gene and upregulated 70 genes which was shown by cDNA-microarray. In silico analysis groups regulated genes into immunological signalling pathways, for example cytokine cytokine-receptor interaction. Several chemokines are regulated at the mRNA-level, e.g. CCL5, CCL17, CCL19, CXCL9 and CXCL10. These chemokines are dose dependently regulated by SFA. The expression of CCL19 was reduced after LPS or Poly I:C/IFN γ stimulation. The ligands interact with two different TLRs. SFA is a pleiotropic chemokine suppressor in comparison to cyclosporin A, rapamycin or dexamethasone. The other immunosuppressive drugs could not suppress all chemokines like SFA. The combined exposure of SFA and CsA resulted in a strengthen chemokine suppression compared to immunosuppressive drugs alone.

CCR7 surface expression on DCs is not influenced by SFA. Chemotaxis assays demonstrated impaired migratory activity of maturing, SFA-exposed DCs against CCL19. This impaired migration is caused by a CD38 suppression. CD38 is an ectoenzyme that was reported to regulate DC migration and cytokine production. CD38 is downregulated at the gene and dose dependent at the protein level after SFA treatment. Vice versa, supernatant of SFA-exposed DCs exhibited impaired activity to promote DC and CD4 T cell migration. The suppressed migration is caused among other things by inhibited chemokine expressions. SFA treated T cells do not migrate as

good as vehicle treated T cells towards the chemoattractants CCL5, CCL17 and CCL19. In vivo, the shortterm treatment of C57BL/6NCrl mice with SFA resulted in a reduced migration of FITC⁺/CD11c⁺ double positive cells to the inguinal lymph node.

In conclusion, this first systematic genome-wide study revealed a novel anti-inflammatory mode of action of SFA being different from the related agent CsA. The results of this thesis identify SFA as a novel DC chemokine and migration inhibitor. Migration of DCs into tissues and secondary lymphoid organs plays a crucial role in initiating the immune response.

2 Zusammenfassung

Sanglifehrin A (SFA) ist ein Immunsuppressivum. Es gehört zur Klasse der Makroliden und wird vom Aktinomyceten Stamm *Streptomyces* A92-308110 produziert. SFA bindet an Cyclophilin A, dem Bindungsprotein von Cyclosporin A (CsA). Obwohl SFA eine höhere Affinität zu Cyclophilin A besitzt als CsA, inhibiert SFA nicht die Aktivität der Calcineurin-Phosphatase, sondern inhibiert die Phosphorylierung der RAF-1 Kinase (Sanchez-Tillo, Wojciechowska et al. 2006). Verschiedene Arbeitsgruppen haben darüber berichtet, dass SFA einzigartige immunsuppressive Effekte bei humanen und murinen Dendritischen Zellen (DCs) zeigt (Steinschulte, Taner et al. 2003; Ko, Hambly et al. 2008). Die Wirkungsweise von SFA ist dennoch nicht vollständig geklärt.

Die vorliegende Dissertation präsentiert neue Daten zur immunregulierenden Funktion von SFA bei DCs. Aus der cDNA-Microarray-Analyse konnte geschlossen werden, dass SFA die konstitutive Expression von 190 Genen herunter und die von 70 Genen hoch regulierte. Die *in silico*-Analyse legt nahe, dass SFA in vielen immunologisch relevanten Signalwegen involviert ist, so zum Beispiel in Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion und zahlreiche Chemokine inhibiert, darunter CCL5, CCL17, CCL19, CXCL9 und CXCL10 auf mRNA-Ebene. Die Chemokinsuppression nach SFA-Behandlung konnte auf Proteinebene dosisabhängig gezeigt werden. Für CCL19 konnte eine Suppression nach vorangegangener LPS oder Poly I:C/IFN γ Stimulation festgestellt werden, diese Liganden interagieren mit zwei verschiedenen TLRs. Gegenüber anderen Immunsuppressiva zeigte allein SFA eine pleiotrope Chemokinsuppression, kein anderes hier untersuchtes Immunsuppressiva (Cyclosporin A, Rapamycin oder Dexamethason) zeigte eine vergleichbare breite Wirkung auf die Chemokinexpression. Die kombinierte Gabe von SFA und CsA sorgte für eine verstärkte Chemokinsuppression im Vergleich zu der alleinigen Gabe eines der beiden Immunsuppressiva.

Die CCR7-Oberflächenexpression der DCs blieb durch SFA unbeeinflusst. Chemotaxis-Assays zeigten eine verminderte Migration von aktivierten SFA-behandelten humanen DCs zu dem Chemokingradienten CCL19, dies ist auf eine Inhibition der CD38-Expression zurückzuführen. CD38 ist ein Ektoenzym, von dem berichtet wird, dass es die DC-Migration und die Zytokin-Produktion reguliert. Auch CD38 wurde auf

Genebene und dosisabhängig auf Proteinebene durch SFA supprimiert. *Vice versa* war die Migration von unbehandelten aktivierten DCs und T-Zellen zu den Überständen SFA-behandelter DCs inhibiert, dies ist u.a. auf eine verminderte Menge an Chemokinen in den Überständen zurückzuführen. SFA-behandelte T-Zellen zeigten auch eine erniedrigte Migration zu den Chemoattraktanten CCL19, CCL5 und CCL17 im Vergleich zu Trägersubstanz-behandelten T-Zellen. *In vivo* konnte eine verminderte Migration von FITC⁺/CD11c⁺-Zellen zum Inguinal-Lymphknoten, von zuvor SFA-behandelten C57BL/6NCrl-Mäusen im Vergleich zu Trägersubstanz-injizierten Mäusen, festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese erste systematische genomweite Studie eine neue anti-inflammatorische Wirkweise von SFA zeigt, die sich von CsA unterscheidet. Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren SFA als einen neuen Chemokin- und Migrationsinhibitor Dendritischer Zellen. Die Migration Dendritischer Zellen in Geweben und sekundäre Lymphorgane spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Immunantwort.

3 Einleitung

3.1 Angeborene und adaptive Immunabwehr

Das Immunsystem ist das Abwehrsystem des menschlichen Körpers und bietet Schutz vor möglichen Krankheitserregern (unter anderen Viren und Bakterien) und schädlichen Substanzen (zum Beispiel freie Radikale). Es dient auch der Beseitigung entarteter körpereigener Zellen. Zur Abwehr stehen dem Körper die angeborene, unspezifische sowie die adaptive, spezifische Immunabwehr zur Verfügung.

Zur angeborenen Abwehr zählen anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, das Komplementsystem, aber auch zellvermittelte Gegenwehr durch zum Beispiel Antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Dendritischen Zellen sowie allgemein entzündliche Reaktionen.

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Im Rahmen dieser Anpassung sind die Zellen der adaptiven Immunabwehr in der Lage, Antigene zu erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen und Antikörper zu bilden. Zwei Gruppen von Zellen stellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunität dar. Die T-Lymphozyten, welche zum einen die zellvermittelte Immunantwort gewährleisten und zum anderen die B-Lymphozyten unterstützen, sowie die B-Lymphozyten selbst, die für die humorale Immunität verantwortlich sind. Nach Aktivierung des adaptiven Immunsystems und erfolgreicher Bekämpfung des Infektionserregers bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, die bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger binnen kurzer Zeit eine schnelle und bessere Abwehrreaktion effizient ermöglichen.

Durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr wird die komplexe Immunreaktion des Körpers ermöglicht.

3.2 Dendritische Zellen

Unter dem Begriff „Dendritische Zelle“ (DC) versteht sich eine heterogene Zellfamilie leukozytären Ursprungs. Dendritische Zellen kommen mit einem Anteil von zirka 0,1 % bis 0,5 % der Leukozyten im Blut und noch geringeren Anteilen in einigen Geweben vor. Dabei sind verschiedene Typen Dendritischer Zellen in fast allen Organen und Geweben vorhanden. Mit ihren sternartig verzweigten Zellkörpern sind Dendritische Zellen (gr.: Baum) prädestiniert sich im Gewebe durch Extension und Retraktion ihrer Fortsätze zu bewegen. Außerdem bieten diese nach Vorkommen unterschiedlichen, entweder langen dünnen oder astartig verdickten Zytoplasma-Zellfortsätze eine große Kontaktoberfläche für die Erkennung und Aufnahme von Antigen und die Adhäsion an naive Lymphozyten an (Banchereau and Steinman 1998).

Die Hauptaufgabe konventioneller Dendritischer Zellen ist die Regulation des Immunsystems. In aller Kürze: Diese Zellen nehmen in der Peripherie des Körpers Antigene auf, prozessieren und präsentieren diese an ihrer Oberfläche, migrieren zum regionalen Lymphknoten, initiieren und regulieren nachfolgend die beginnende adaptive Immunantwort (Banchereau and Steinman 1998; Caux, Ait-Yahia et al. 2000).

3.3 Einteilung Dendritischer Zellen

Seit der ersten Beschreibung der Dendritischen Zellen (DCs) durch Steinman und Cohn (Steinman and Cohn 1973) wurde ersichtlich, dass DCs heterogen sind, jede mit einer besonderen Lokalisation und spezifischer Funktion im Immunsystem (Shortman and Liu 2002). Dendritische Zellen kommen nur in geringen Mengen vor und ihre Vorstufen sind noch seltener anzutreffen. Daraus ergibt sich die Schwierigkeit, diese Zellen zu isolieren und eine Systematik der DC-Entwicklung zu finden. DCs können sowohl aus lymphatischen- als auch aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen (Traver, Akashi et al. 2000; Manz, Traver et al. 2001; Chicha, Jarrossay et al. 2004; Shigematsu, Reizis et al. 2004; Jacobs, Wuttke et al. 2008). Obwohl alle DCs Antigene aufnehmen, prozessieren und T-Zellen präsentieren können, unterscheiden sie sich in der Lokalisation, in ihrem Migrationsverhalten und in ihrer detaillierten immunologischen Funktion. Die Bezeichnung der DC-Gruppen werden in Tabelle 3.1 nach Shortman und Naik dargestellt (Shortman and Naik 2007). Hierbei werden die Dendritischen Zellen in Prä-DCs, konventionelle DCs und inflammatorische DCs unterschieden.

Tabelle 3.1 Kategorien der Dendritischen Zellen nach Shortman und Naik 2007.

Prä-Dendritische Zellen:
Prä-Dendritische Zellen sind Zellen ohne dendritische Form und DC-Funktion aber mit dem Potential eine DC zu werden, wofür ein inflammatorisches oder mikrobielles Signal benötigt wird. Verschiedene Prä-DCs führen zu verschiedenen DC-Untergruppen. Beispiele für Prä-DCs: Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) und Monozyten.
Konventionelle DCs:
Diese Zellen haben die DC-Morphologie und -Funktion. Konventionelle DCs (<i>conventional DC</i> , cDC) können wiederum in zwei Gruppen unterteilt werden. <u>Migratorische DCs:</u> Diese sind die im Lehrbuch beschriebenen, klassischen DCs. Sie agieren als „Wächter“ in peripheren Geweben. Sie migrieren nach Aktivierung mit dem aufgenommenen Antigen aus der Peripherie zum Lymphknoten. Dort präsentieren sie T-Zellen das prozessierte Antigen. Beispiele: Langerhans-Zellen und dermale DCs. <u>Im Lymphgewebe-verbleibende Dendritische Zellen:</u> Diese Zellen migrieren nicht durch die Lymphe. Ihre Funktion und Lebensdauer ist begrenzt auf ein Lymphorgan. Die Zellen sammeln und präsentieren fremd- und eigen-Antigen in diesem Lymphorgan. Die Zellen werden im Maussystem noch weiter unterschieden: $CD4^+CD8^-$ cDCs, $CD4^-CD8^-$ cDCs und $CD4^-CD8^+$ cDCs. Beispiele: Thymus-cDCs und Milz-cDCs.
Inflammatorische DCs:
Diese DCs sind im <i>steady-state</i> nicht präsent und werden erst nach erfolgter Entzündung oder Infektion gebildet. Beispiel: TNF- und NO-Synthase-produzierende DCs (TIP DCs). Inflammatorische Monozyten können inflammatorische DCs bilden.

Inflammatorische DCs können *in vitro* aus Monozyten durch die Gabe von GM-CSF und IL-4 generiert werden (Sallusto and Lanzavecchia 1994).

3.4 Reifung Dendritischer Zellen

In Dendritischen Zellen reichen im Unterschied zu anderen Phagozyten nano- und pikomolare Antigenkonzentrationen für eine effiziente Antigen-Präsentation aus (Sallusto, Cella et al. 1995). Extrazelluläre Antigene werden von Dendritischen Zellen adsorptiv über Endozytoserezeptoren oder unspezifisch über den Vorgang der Makropinozytose aufgenommen. Anders als bei Makrophagen, die Proteine sofort nach der Internalisierung in ihre Aminosäure-Bestandteile zerlegen, findet in den Lysosomen Dendritischer Zellen eine länger andauernde Prozessierung bei gleichzeitiger Bildung der Antigen:MHC-II-Komplexe statt (Turley, Inaba et al. 2000).

Im Vergleich zu B-Zellen und Monozyten im Lymphknoten zeigen DCs eine 10- bis 100-fach höhere Expression von Peptid:MHC-Komplexen (Inaba 1997). Der T-Zell-Rezeptor besitzt eine relativ geringe Affinität zu seinem Liganden. Trotzdem kann bereits eine Dendritische Zelle wegen des hohen Besatzes mit MHC-Molekülen 100-3000 T-Zellen in einer gemischten Leukozyten-Reaktion stimulieren (Banchereau and Steinman 1998).

Zur effektiven Stimulation von T_H -Zellen ist die Präsenz von drei Signalen Voraussetzung. In der „immunologischen Synapse“ (Monks, Freiberg et al. 1998) zwischen der Dendritischen Zelle und der T_H -Zelle binden der Komplex Peptid:MHC-II (Signal 1) und kostimulatorische Moleküle (Signal 2) an ihre Liganden, den T-Zellrezeptor (TCR) und CD28. Das dritte, direkt polarisierende Signal sind PRR-vermittelte (*Pattern-recognition receptor*) Zytokine. Im Falle der Bindung von PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*) aus Bakterien, Viren und Pilzen besteht das Signal aus dem Zytokin IL-12 und induziert eine T_{H1} -Zelle (Kapsenberg 2003). Neuere Daten zeigen, dass für die T_{H1} -Richtung neben IL-12 selbst auch die Stärke des TCR-Signals, die Zytokine IL-27 und IL-23 entscheidende Einflüsse haben (Trinchieri, Pflanz et al. 2003). Moleküle wie z. B. IL-10, TGF- β und Kortikosteroide hemmen die Reifung der DCs und damit die Produktion von IL-12, wodurch eine T_{H2} -Antwort bzw. eine regulatorische T-Zellantwort induziert wird (Liu and Zheng 2001). Sofern das Antigenpeptid von einem MHC-I-Molekül präsentiert wird, was bei zytosolischen, viralen und kreuzpräsentierten Peptiden auf Dendritischen Zellen der Fall ist, wird die Entstehung von zytotoxischen T-Effektorzellen ($CD8^+$) gefördert.

3.5 Migration von Dendritischen Zellen

Die Fähigkeit Dendritischer Zellen (DC) zu migrieren, beruht unter anderem auf einer veränderten Expression verschiedener Chemokinrezeptoren während dem Prozess der Reifung. Rekrutierung und Migration unreifer DCs in die Lymphknoten werden durch diese veränderte Rezeptorexpression reguliert (Delgado, Finkel et al. 1998; Dieu, Vanbervliet et al. 1998; Sallusto, Lanzavecchia et al. 1998; Sozzani, Allavena et al. 1998; Yanagihara, Komura et al. 1998). CCR7 wird zum Beispiel auf reifen DCs exprimiert. CCR7 ist der Rezeptor für CCL19 und ermöglicht den reifen Zellen entlang eines CCL19-Gradienten zum Lymphknoten zu wandern.

Außerdem sind für die Migration Dendritischer Zellen noch weitere Faktoren wie der Kalziumionen-Influx in die Zellen und Chemokine wichtig. Das Ektoenzym CD38 produziert einen wichtigen Ca^{2+} -mobilisierenden Metaboliten, die cADP-Ribose. cADPR bindet an einen Rhyanoidrezeptor und bewirkt so den Ca^{2+} -Influx in die Zelle. Das Kalzium wird bei DCs zur Migration gebraucht (Partida-Sanchez, Goodrich et al. 2004; Shi, Partida-Sanchez et al. 2007; Barbet, Demion et al. 2008; Randolph, Ochando et al. 2008). CD38 ist für die *in vitro* und *in vivo* Migration von Neutrophilen und DCs zu einigen, aber nicht allen, Chemokinen wichtig. $\text{CD38}^{-/-}$ -DCs sind z.B. unfähig entlang eines Gradienten zu CCL19 zu wandern (Shi, Partida-Sanchez et al. 2007). Im Unterschied zu $G_{\alpha i}$ -Proteinen, die für die Chemotaxis aller hämatopoetischer Zellen zu allen Chemoattraktanten wichtig ist, ist der CD38-abhängige alternative Signalweg G_q -Klasse abhängig. Ähnlich zum klassischen Signalweg wird der alternative Signalweg aktiviert durch $G_{\alpha i2}$ -Protein (Shi, Partida-Sanchez et al. 2007).

Die Fähigkeit Chemokine zu produzieren, ist entscheidend für die Migration von DCs. Chemokine binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und bewirken dort Konformationsänderungen, die intrazelluläre Signalwege aktivieren. Bei der Rekrutierung von Leukozyten (Förster, Emrich et al. 1994; Baggiolini 1998; Thelen and Stein 2008) und bei dem *homing*-Prozess von Lymphozyten in lymphatische Organe sind Chemokine entscheidend (Förster, Mattis et al. 1996; Nagasawa, Hirota et al. 1996; Cyster 1999). Bei der Migration sind Chemokine in der Lage Integrine (wie LFA-1, Mac-1 und VLA-4) auf zirkulierenden Leukozyten zu aktivieren, über die eine feste Bindung am Endothel ermöglicht wird. Nach transendothelialer Migration, die molekular bisher nur unvollkommen verstanden ist, steuern Chemokine dann weiter innerhalb des Gewebes oder Organs die Wanderung der Leukozyten entlang eines

Chemokin-Gradienten. Die Migration wird entweder chemotaktisch über lösliche Chemokine oder haptotaktisch über gebundene Chemokine gesteuert. Entscheidend für die Haptotaxis ist eine lokal hohe Konzentration von gebundenen Chemokinen, wohingegen ein Konzentrationsgradient von freien Chemokinen für die Chemotaxis wichtig ist (Grabovsky, Feigelson et al. 2000; Alon and Feigelson 2002; Alon, Grabovsky et al. 2003; Tanaka, Adams et al. 1993; Webb, Ehrenguber et al. 1993; Schall and Bacon 1994; Cinamon, Grabovsky et al. 2001; Banas, Wornle et al. 2002; Allen, Crown et al. 2007).

Dendritische Zellen produzieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Reifung verschiedene Chemokine (Abbildung 3.1, (Piqueras, Connolly et al. 2006). Die unreife Dendritische Zelle produziert nach Antigenaufnahme die Chemokine CXCL1-3 und CXCL16. Diese Chemokine locken u.a. T_{H1} -Effektor-Zellen an, die Chemokinrezeptoren CXCR6 und CXCR1-2 auf ihrer Oberfläche tragen. Während des Reifungsprozesses und der Migration durch die afferente Lymphe zum Lymphknoten werden die inflammatorisch induzierten Chemokine CCL3-5 und CXCL9-10 von den Dendritischen Zellen produziert. Diese Chemokine locken Zellen mit den Oberflächenmarkern CCR5 und CCR3 an. Zu diesen Zellen zählen auch die Effektor-T-Gedächtniszellen und Monozyten. Nach erfolgter Reifung exprimieren Dendritische Zellen CCL19, CCL22 und CXCL13, die reifen DCs, naiven T-, B-, T_{H2} - und regulatorischen T-Zellen zur Anlockung dienen.

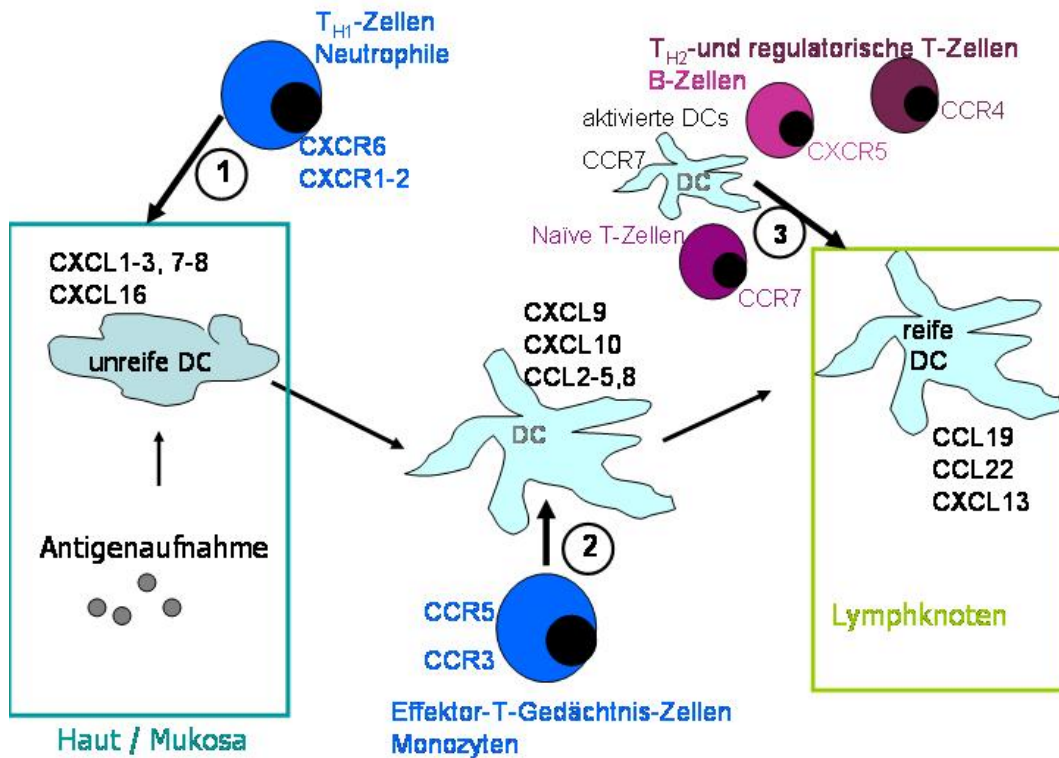


Abbildung 3.1 Chemokinproduktion von Dendritischen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Reifung; DC: Dendritische Zelle (modifiziert nach Piqueras 2006)

3.6 Chemokine

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die von vielen Zelltypen sezerniert werden können. Mittlerweile sind ca. 50 verschiedene Chemokine bekannt, die in vier Familien unterschieden werden. Die Unterteilung erfolgt aufgrund ihrer Struktur oder Funktion. Seit einigen Jahren gibt es eine systematische Einteilung der Chemokine anhand ihrer Struktur. Sie teilt die Chemokine ein in CC, CXC, CX₃C und Lymphotactin, was als einziges Familienmitglied der vierten Gruppe einen einzigen Cysteinrest besitzt.

Die Proteingrößen der Chemokine liegen zwischen 8 und 14 kDa. Nur CXCL16 und CX₃CL1 können über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert sein, alle anderen bekannten Chemokine kommen „frei beweglich“ vor, die aber auch zum Teil über ihren längeren C-Terminus an Proteoglykane binden können. Die CC-Chemokine bilden die größte Gruppe. Die ersten beiden Cysteinreste, vom N-Terminus aus betrachtet, liegen direkt nebeneinander. CC-Chemokine ziehen mononukleäre Zellen an den Ort der chronischen Entzündung (Charo and Ransohoff 2006). Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Migrationsvorgängen von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen. Außerdem greifen sie in

eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen ein sowie in die Organentwicklung (Rossi and Zlotnik 2000). Chemokine werden entweder konstitutiv (homöostatisch) oder inflammatorisch gebildet.

3.6.1 Homöostatische Chemokine

Zu den konstitutiv gebildeten Chemokinen zählen CCL17-19, CCL21, CCL22, CXCL12 und CXCL13. Diese Chemokine wirken homöostatisch und können auf die B- und T-Zellentwicklung sowie die Entwicklung lymphatischer Organe Einfluss nehmen (Butcher and Picker 1996; Förster, Mattis et al. 1996; Förster, Schubel et al. 1999; Ansel, Ngo et al. 2000).

Sowohl CCL19 als auch CCL21 werden konstitutiv in verschiedenen Lymphgeweben und in der Lunge exprimiert. Im lymphatischen Gewebe wird CCL19 hauptsächlich von Dendritischen Zellen, Stromazellen und dem Endothel sezerniert. Auf den *high endothelial venules* (HEVs) der Lymphknoten wird sowohl CCL19 und CCL21 exponiert, wobei aber nur CCL21 von den HEVs selbst exprimiert, CCL19 hingegen durch Transendozytose auf die basolaterale Oberfläche des Endothels transportiert wird. Auf afferenten Lymphkapillaren der Lymphknoten konnte ebenfalls CCL21 nachgewiesen werden, wodurch reife DCs in den Lymphknoten dirigiert werden (Vassileva, Soto et al. 1999; Baekkevold, Yamanaka et al. 2001; Kriehuber, Breiteneder-Geleff et al. 2001; Nakano and Gunn 2001; Luster 2002; Okada, Ngo et al. 2002). Neben der konstitutiven Expression der homöostatischen Chemokine kann die Expression von CCL19 *in vitro* durch LPS in Dendritischen Zellen induziert werden (Sallusto, Palermo et al. 1999). Die Migration von CCR7-exprimierenden Zellen in die unterschiedlichen lymphatischen Organe wird über CCL19 oder CCL21 gesteuert. Im Gewebe selbst spielen die Chemokine CCL19 und CCL21 bei der Initiierung einer Immunantwort eine wichtige Rolle, indem sie naive T-Zellen und Dendritische Zellen in der T-Zellzone zusammenbringen (Springer 1994; Butcher and Picker 1996; Förster, Mattis et al. 1996; Förster, Schubel et al. 1999).

CCL17 zum Beispiel ist ein anderes homöostatisches Chemokin, dass auch unter dem Namen TARC bekannt ist. TARC steht für „*Thymus and activation regulated chemokine*“. Das Chemokin CCL17 wird hauptsächlich von Dendritischen Zellen im Thymus gebildet (Lieberam and Förster 1999; Alferink, Lieberam et al. 2003). Außerdem wird CCL17 konstitutiv in einer geringeren Menge in Lunge, Darm, den kleinen Intestinen und transient in stimulierten mononukleären Zellen im peripheren Blut gebildet. Humane myeloide DCs produzieren CCL17, während pDCs kein CCL17 produzieren (Penna, Vulcano et al. 2002; Penna, Vulcano et al. 2002). Seit 2001 ist bekannt, dass auch *monocyte-derived DCs* CCL17 exprimieren (Vissers, Hartgers et al. 2001). CCL17 ist der Ligand für den CCR4-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird bevorzugt von T_{H2}-Zellen gebildet (Bonecchi, Bianchi et al. 1998). CCL17 wird im Maussystem ausschließlich von reifen DCs gebildet, die in peripheren lymphatischen oder nicht-lymphatischen Organen lokalisiert werden. Interessanterweise kann die CCL17-Expression in der Milz nicht stimuliert werden (Alferink, Lieberam et al. 2003). Die Untersuchung von CCL17^{-/-}-knockout-Mäusen zeigt, dass die Mäuse eine verringerte T-Zell-abhängige Kontakthypersensibilisierungsantwort und ein vermindertes Abstoßen von allogenen Organtransplantaten zeigen (Alferink, Lieberam et al. 2003).

3.6.2 Inflammatorische Chemokine

CCL2-CCL5, CCL11, CCL16, CXCL1-5, CXCL7-10 und CX₃CL1-2 werden inflammatorisch induziert gebildet. Die Expression inflammatorischer Chemokine wird durch inflammatorische Zytokine, wie IL-1, TNF- α oder IFN- γ induziert. Die induzierten Chemokine spielen bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten, Allergieantworten, Entzündungen oder Infektionen eine große Rolle. Ihre Synthese wird aber auch durch Virus-Infektionen wie zum Beispiel durch humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) den Zytomegalie-Virus (CMV) oder durch bakterielle Toxine wie LPS angeregt (Kligman 1994; Keane, Standiford et al. 1997; Rossi and Zlotnik 2000; Arenberg, White et al. 2001; Koch, Volin et al. 2001; Strieter and Belperio 2001) (Moore, Wada et al. 1998).

CCL5, auch RANTES genannt, fungiert als Chemoattraktant auf Blut-Monozyten, T-Helfergedächtniszellen und Eosinophile. Das Chemokin ist ein wichtiger HIV-Suppressionsfaktor, welcher von CD8⁺-T-Zellen produziert wird. CCL5 ist der natürliche Ligand für den CCR5-Rezeptor und supprimiert die *in vitro*-Replikation des

R5-Stamms von HIV-1, welches CCR5 als Korezeptor nutzt (Lehner 2002; Nazari and Joshi 2008).

Die beiden Chemokine CXCL9 und CXCL10 werden nach einer älteren Bezeichnung als MIG und IP-10 bezeichnet. Die ältere Bezeichnung besitzt im Maussystem immer noch an Bedeutung. MIG (*monokine induced by IFN γ*) und IP-10 (*IFN γ -inducible protein*) werden von verschiedenen Zelltypen nach Stimulation durch pro-inflammatorische Zytokine gebildet und binden beide an den Rezeptor CXCR3. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von mononukleären Zellen (Gouwy, Struyf et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von CXCL9 zu einer Reduzierung von akuten Lungen-Transplantatabstoßungsreaktionen führte (Belperio, Keane et al. 2003).

3.7 Immunsuppressiva

Immunsuppressiva sind Medikamente, die für die Dämpfung des Immunsystems verantwortlich sind. Die immun-unterdrückende Funktion dieser Medikamente ist besonders bei Transplantationen, Autoimmunerkrankungen und allergischen Entzündungsreaktionen wie zum Beispiel bei Asthma bronchiale erwünscht. Die Immunsuppressiva werden in verschiedene Wirkstoffklassen eingeteilt, zu den die Glukokortikoide, nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente, Zytostatika, Calcineurininhibitoren, Rapamycin, Sanglifehrin A, spezifische Antikörper und *biological response modifiers* gehören.

3.7.1 Glukokortikoide

Zu den Glukokortikoiden zählt u.a. Dexamethason (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) und Cortisonacetat (11-Dehydro-17-hydroxycorticosteron-21-acetat). Sie binden an den intrazellulären Glukokortikoid-Rezeptor. Danach folgt die Translokation in den Zellkern, wo sie u.a. einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B eingehen können. Sie hemmen somit die Transkription der NF- κ B-regulierten Gene (Abbildung 3.2). Zielproteine sind je nach Zelltyp Entzündungsfaktoren (IL-1, IL-2, IL-2R, IL-6, TNF α u.v.a.). Glukokortikoide rufen eine unspezifische Immunsuppression hervor und werden z.B. bei chronischen/akuten Entzündungen, Allergien und nach Transplantationen eingesetzt. Die Nebenwirkungen von Dexamethason zeigen sich vor allem bei Langzeittherapien unter anderen durch latente Typ 1 Diabetes, Umverteilung des Fettgewebes, Wasserretention und Reaktivierung latenter Infekte.

3.7.2 Calcineurininhibitoren, Rapamycin und Sanglifehrin A

Die Proteinphosphatase Calcineurin hat besonderes Interesse gefunden, da sie die immunsuppressive Wirkung der bei Organ- und Gewebetransplantationen häufig eingesetzten Pharmaka Cyclosporin A (CsA) und FK506 vermittelt. Der biochemische Angriffspunkt der beiden Pharmaka war lange unklar gewesen. In ersten Untersuchungen wurde gezeigt, dass Cyclosporin A und FK506 spezifisch an zwei Proteinen binden, die als Cyclophilin bzw. als FK506-Bindungsprotein bezeichnet werden. Beide Proteine besitzen die Eigenschaft von Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (Übersicht: (Fischer, Hauber et al. 1994)).

Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A und FK506 war mit diesen Beobachtungen zunächst nicht zu klären. Erst mit der Entdeckung, dass Cyclosporin A und FK506 ihren immunsuppressiven Effekt zusammen mit ihren zellulären Rezeptoren über eine Inhibition von Calcineurin ausüben, wurde klar, dass die Immunsuppression durch eine komplexe Reaktionskette vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Komplexe Cyclosporin A/Cyclophilin A und FK506/FK506-Bindungsprotein an Calcineurin binden und deren Phosphataseaktivität inhibieren. Daraus folgt, dass der im Ruhezustand im Zytosol in phosphorylierter Form vorliegende Transkriptionsfaktor NFAT nicht dephosphoryliert werden kann. Somit wird die IL-2-Transkription inhibiert. IL-2 kann als extrazelluläres Signalmolekül die Proliferation von Lymphozyten stimulieren (Abbildung 3.2).

Sanglifehrin A (SFA) ist ein erst 1999 von Sanglier, Fehr und Mitarbeitern entdeckter Arzneistoff (Sanglier, Quesniaux et al. 1999). Es wird von dem Actinomyceten Stamm *Streptomyces* A92-308110 produziert und gehört zur Klasse der Makrolide. SFA bindet an Cyclophilin A (Cyp A), dem Bindungsprotein von Cyclosporin A (CsA), mit einer 20-fach höheren Bindungsaffinität. Im Gegensatz zu CsA zeigt der Cyclophilin-SFA-Komplex keinen Effekt auf die Kalzium-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin (Zenke, Strittmatter et al. 2001). Im Gegensatz zu den Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK506 zeigt SFA weder eine IL-2-Suppression (Zenke, Strittmatter et al. 2001; Zhang and Liu 2001; Zhang, Youn et al. 2001) noch eine inhibierte IL-2-Rezeptor-Expression (Zhang and Liu 2001) bei T-Zellen. Hierzu gibt es eine weitere Arbeit, die die Hemmung der IL-2-Produktion zeigt (Allen, Zheng et al. 2004). Neue Erkenntnisse zeigen, dass Sanglifehrin A die Phosphorylierung der RAF-1-Kinase inhibiert (Sanchez-Tillo, Wojciechowska et al. 2006) und so die nachfolgende Signalkaskade, dem RAF-MEK-ERK-Signalweg, beeinflusst. Es liegen bislang aber keine direkten Interaktionsstudien zwischen SFA und RAF-1-Kinase vor.

Rapamycin (Sirolimus) ist ein makrozyklisches Immunsuppressivum. Rapamycin und FK506 sind miteinander verwandte Substanzen, die aus unterschiedlichen Streptomyceten isoliert wurden, jedoch einen unterschiedlichen Wirkmechanismus haben. Rapamycin inhibiert eine Reihe von Zytokin-vermittelten Signaltransduktionswegen durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), einer 282 kDa großen Phosphoinositid-3-Kinase. Durch diese Bindung kann die Proteinsynthese der S6-Kinase nicht erfolgen (p70SK6). Die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 bleibt somit aus. Die Hemmung von mTOR verhindert die Aktivierung der p34cdc2-Kinase und somit die Komplexbildung mit Cyclin E. Dies hat zur Folge, dass das Voranschreiten der T-Zellen von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert wird. Die schematische Darstellung dieser Vorgänge ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

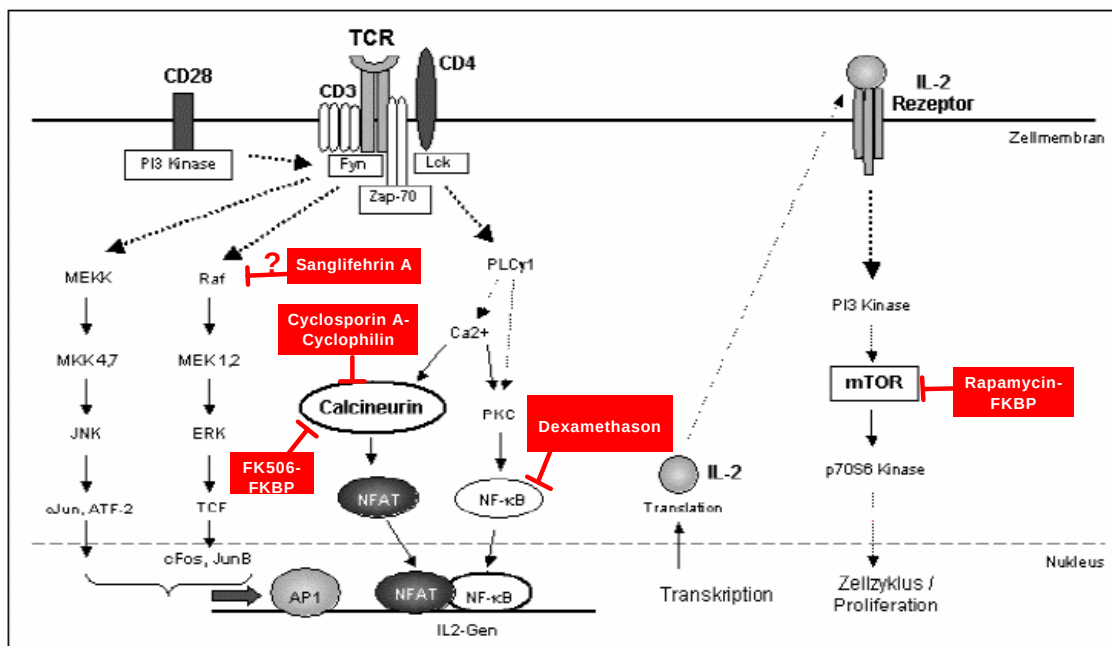


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung des Eingreifens der Immunsuppressiva Dexamethason, Cyclosporin A (CsA), FK506 (Tacrolimus), Sanglifehrin A (SFA) und Rapamycin (Sirolimus) in verschiedene Signaltransduktionswege (Abb. modifiziert nach der Dissertation von Kieselbach, B.: Molekulare Effekte der Immunmodulation mit einem anti-CD4-Antikörper, 2004, Humboldt-Universität Berlin)

Zu dem Nebenwirkungsprofil von FK506 und Cyclosporin A zählen neben einer Hepatotoxizität und Neurotoxizität u.a. die Entwicklung metabolischer Stoffwechselveränderung (Cattaneo, Perico et al. 2004; Martins, Ventura et al. 2004; Wu, Shu et al. 2004; Chapman and Nankivell 2006). Die Nephrotoxizität steht ganz im Vordergrund, die sowohl akut als auch chronisch Schäden am transplantierten Organ bewirken kann. Rapamycin wirkt deutlich weniger nephrotoxisch im Vergleich mit den Calcineurininhibitoren CsA und FK506. Die antiproliferative Wirkung von Rapamycin führt allerdings zu vermehrtem Auftreten von Wundheilungsstörungen durch die eingeschränkte Entwicklung von fibrösem Gewebe (Johnson, Kreis et al. 2001).

3.8 Zielsetzung

Bei Autoimmunkrankheiten (z.B. Lupus erythematoses und Rheumatoide Arthritis) und nach Organtransplantationen (z.B. Herz-, Leber- und Nierentransplantation) werden Patienten mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt. Für den richtigen Einsatz dieser Medikamente und die Kombination mit anderen Medikamenten ist es wichtig die Zielzellen der jeweiligen Substanzen, deren Wirkmechanismus im Immunsystem und ihre Nebenwirkungen genau zu verstehen. Zu den Zielzellen von Immunsuppressiva zählen auch Dendritische Zellen. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion und Suppression von Immunantworten (Banchereau and Steinman 1998; Hackstein, Morelli et al. 2001). Sanglifehrin A (SFA) ist ein relativ neues Immunsuppressivum (Sanglier, Quesniaux et al. 1999), das strukturelle Ähnlichkeit mit dem weltweit am häufigsten eingesetzten Immunsuppressivum Cyclosporin A aufweist. Mit SFA wurde bereits in Dendritischen Zellen gearbeitet und es konnte eine immunmodulierende Wirkung des Medikamentes gezeigt werden (Steinschulte, Taner et al. 2003; Ko, Hambly et al. 2008). Im Gegensatz zu Cyclosporin A sind jedoch die immunbiologischen Wirkmechanismen und die Zielzellen im Immunsystem nicht aufgeklärt.

Ziel dieser Studie ist es, eine systematische Analyse der funktionellen Veränderung der Genexpression durch SFA in DCs durchzuführen.

Um weitergehende Kenntnisse über die Funktion von Sanglifehrin A zu gewinnen werden humane Monozyten mit GM-CSF und IL-4 kultiviert, um daraus Dendritische Zellen zu gewinnen (*monocyte-derived Dendritic Cell*, MoDC). Aus diesen Zellen sollen nach Behandlung mit dem Immunsuppressivum Sanglifehrin A RNA isoliert und auf transkriptionelle Änderungen mit Hilfe der *cDNA-Microarray*-Technik hin untersucht werden. Die gewonnenen Ergebnisse werden auf Proteinebene verifiziert. Darüber hinaus soll eine Aussage über die funktionellen Auswirkungen der gefundenen RNA- und Proteinexpressionsänderungen, bedingt durch SFA, ermittelt werden. Das Eingreifen von SFA soll *in vitro* und in *in vivo* Versuchen bestätigt werden.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Immunsuppressiva

Cyclosporin A = Ciclosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Rapamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Sanglifehrin A	zur Verfügung gestellt von Dr. R. Sedrani, Novartis Pharma, Basel, CH

4.1.2 Zytokine

rh CCL5	Immunotools, Friesoythe, D
rh CCL17	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
rh CCL19	Immunotools, Friesoythe, D
rh GM-CSF	Promocell GmbH, Heidelberg, D
rh Interleukin-4	Strathmann Biotec GmbH Co. KG, Hamburg, D
Interferon- γ (<i>E.coli</i>)	Promocell GmbH, Heidelberg, D

4.1.3 Antikörper

Die verwendeten konjugierten Antikörper liegen mit den folgenden aufgeführten Fluoreszenzfarbstoffen vor: APC steht für Allophycocyanin, PE für Phycoerythrin, FITC für Fluorescein-5-isothiocyanat und das Tandem-Konjugat PE-Cy7 steht für Phycoerythrin und dem Cyanin-Farbstoff Cy7.

Anti-human IL1RII mouse IgG1, Klon: MNC2	Alexis Biochemicals, Lörrach, D
APC anti-human CCR7 mouse IgG2a, Klon: 150503	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
APC anti-human CD1a mouse IgG1 κ , Klon: HI149	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC anti-human CD38 mouse IgG1 κ , Klon: HIT2	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC anti-mouse CD11c Armenian Hamster IgG1 λ 2, Klon: HL3	BD Pharmingen™, Heidelberg, D

APC anti-mouse IgG1 λ 1, Klon:G235-2356	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC anti-mouse IgG2a κ , Klon: G155-178	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC anti-mouse IgG2 κ , Klon: G155-178	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC anti-human CD14 mouse IgG2 κ , Klon: M5E2	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC anti-human CD1a mouse IgG1 κ , Klon: HI149	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC anti-mouse CD3e hamster IgG1 κ , Klon: 145-2C11	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC anti-mouse IgG1 κ , Klon: MOPC-21	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-human CD14 mouse IgG2a κ , Klon: M5E2	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-mouse IgG1, Klon: A85-1	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-mouse IgG2a κ , Klon: 27-35	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE-Cy7 anti-human CD4 mouse IgG1 κ , Klon: SK3	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE-Cy7 anti-human CD8 mouse IgG1 κ , Klon: HIT8a	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE-Cy7 anti-mouse IgG1 κ , Klon: MOPC-21	BD Pharmingen™, Heidelberg, D

4.1.4 Fertige Reagenziensätze

CD14 ⁺ Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD4 ⁺ Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Human I-309 DuoSet ELISA	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Human IL-1RII DuoSet ELISA	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Human MIP-3 β DuoSet ELISA	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Human RANTES DuoSet ELISA	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Human TARC DuoSet ELISA	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Leukocount Kit	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
OptEIA human IL-12p70 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
OptEIA human IP-10 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
OptEIA human MIG ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden, D

RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
RNase-free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Whole Human Genome Oligo Microarray Kit	Agilent Technologies, Palo Alto, USA

4.1.5 Chemikalien

Aqua ad iniectabilia	Baxter S.A., Lessines, B
Assay diluent BD OptEIA™	BD Biosciences, Heidelberg, D
Rinderserum Albumin	SERVA, Heidelberg, D
Cellfix™ (10x)	BD Biosciences, Erembodegem, B
Cyanine 3-CTP	PerkinElmer, Rodgau, D
Cyanine 5-CTP	PerkinElmer, Rodgau, D
Dulbecco's PBS (10x) ohne Ca ²⁺ & Mg ²⁺	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Uppsala, S
FITC Isomer I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Global rodent breeding	Harlan Teklad, Bicester, UK
Hanks Solution (HBSS)	Cambrex Bio Science, Verviers, B
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm, D
HEPES	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum-Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, D
Lipopolysaccharid (<i>E.coli</i> , 026:B6)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumpyruvat (100mM)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren 100x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PEG300	Sigma, Steinheim, D
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS 1x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Polyinosinic polycytidylic acid (Poly I:C)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Polysorbate 80	Merck, Darmstadt, D
RPMI 1640 mit Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
RBC Lysis Solution	Qiagen, Hilden, D

TMB Substrat Reagent Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

Maxisorp, Nunc-Immuno Platte	Nunc, Roskilde, DK
Transwell® 5µm Polycarbonat	Corning Costar, NY, USA

4.1.7 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
AutoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, D
Durchflussszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, D
ELISA Reader SLT Spectra	SLT LabInstruments Deutschland GmbH, D
NanoDrop® ND 1000 Spektralphotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA

4.1.8 Computersoftware

Synelisa Software	Pharmacia & Upjohn Diagnostics, Freiburg, D
Axon GenePix 5.0 Pro	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
CellQuest™, Version 3.2.1f1	Becton Dickinson, Heidelberg, D
WinMDI, Version 2.8	Joe Trotter, Scribbs Research Institute, La Jolla, USA
Weasel, Version 2	WEHI, Melbourne, AU
SPSS® Software, Version 14	SPSS Inc., Chicago, USA

4.1.9 Humanes Probenmaterial

Die Isolation humaner Monozyten, PBMCs und T-Zellen erfolgte aus frischen *buffy coats* gesunder Blutspender des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Giessen. Alle Blutspender stimmten einer Verwendung überschüssigen Materials ihrer Blutspende zu wissenschaftlichen Zwecken zu.

4.1.10 Tiere

Für die vorliegende Arbeit wurde der Mausstamm *Mus musculus domesticus* C57BL/6NCrl verwendet. Die Tiere wurden von Charles River, Sulzfeld, D bezogen und in die Tierhaltung der Justus-Liebig Universität Gießen aufgenommen. Die Tiere wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes (NIH Publication No. 86-23, revised 1985) gehalten. Dem Tierversuchsvorhaben liegt die Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen mit dem Titel: „Sanglifehrin A im Immunsystem“ zugrunde.

4.2 Methoden

4.2.1 Zell- und Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus dem *buffy coat*

PBS/EDTA/BSA-Puffer:	1 x PBS
	2 mM EDTA
	0,5 % (w/v) BSA
	0,2 µm filtriert

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Probanden über Standard-Dichtezentrifugation (Böyum, 1968) gewonnen. Das unter sterilen Kautelen entnommene Blut aus einen *buffy coat* (Volumen 80 mL) wurde in drei sterile 50 mL-Gefäße aufgeteilt und mit jeweils 30 mL Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gemischt. Es wurden 4x 15 mL Ficoll-Paque (1,077 g/mL) in sterile 50 mL-Gefäße vorgelegt und mit dem Blut/PBS-Gemisch auf 50 mL geschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 30` bei 360 xg bei RT ohne Bremse. Durch die Zentrifugation passierten Erythrozytenaggregate und tote Zellen höherer Dichte die Ficoll-Schicht, während Granulozyten in die Ficollphase eindringen. Mononukleäre Zellen sammelten sich in der Interphase an. Der Interphasenring wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in zwei 50 mL-Gefäße überführt und mit PBS auf 50 mL aufgefüllt. Nachfolgend wurde eine Zentrifugation von 10` bei 460 xg durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde aufgerüttelt und in 50 mL PBS aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation von 10` bei 80 xg. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Die Zellen wurden vereinigt und in 5 mL PBS/EDTA/BSA-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Ein Aliquot wurde für die Zellzahlbestimmung entnommen. Die Zellen wurden auf $1,0 - 3,0 \times 10^8$ Zellen eingestellt.

4.2.1.2 Reinigung von CD14⁺-Zellen mit Hilfe des *automated magnetic activating cell sorting* (AutoMACS)

DC-Medium:	RPMI 1640
	10% FCS
	1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
	1% HEPES
	1% nicht-essentielle Aminosäuren
	1% Natriumpyruvat
komplettiertes DC-Medium:	DC-Medium
	1000 IU/mL IL4
	1000 IU/mL GM-CSF
PBS/EDTA-Puffer:	1 x PBS
	2 mM EDTA
	0,2 µm filtriert
PBS/EDTA/BSA-Puffer:	1 x PBS
	2 mM EDTA
	0,5 % (w/v) BSA
	0,2 µm filtriert

Die Reinigung der Monozyten erfolgte mit Hilfe der CD14⁺ -*Microbeads* (Miltenyi Biotec). Das Prinzip der Trennung beruht auf der magnetischen Markierung von CD14⁺-Zellen mit Hilfe der *Microbeads*. Die markierte Zellsuspension wird auf eine mit Eisenkügelchen gefüllte Trennsäule geladen und durch das Anlegen eines elektromagnetischen Feldes auf der Säule retentiert, während unmarkierte Zellen die Trennsäule passieren können. Nach Entfernung der Magnetisierung können die Monozyten als positive Zellfraktion von der Säule eluiert werden.

1,0 – 3,0 x 10⁸ PBMCs wurden mit 100 µL bis 300 µL CD14⁺-*Microbeads* in einem sterilen 15mL-Gefäß versetzt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 15` wurde das 10-fache Volumen an PBS auf das Zell/*bead*-Gemisch gegeben und 5` bei 300xg gewaschen. Überschüssiges PBS wurde entfernt und in 0,5 - 1,5 mL PBS/EDTA/BSA-Puffer aufgenommen. Die positive Selektion der Zellen wurde am *AutoMACS* mit dem

Programm „Posseld“ durchgeführt. Aus der positiven Fraktion wurde ein Aliquot entnommen und mit PBS 1:10 verdünnt. Danach erfolgte die Zellzählung am automatischen Hämatologieanalysator KX-21N. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro mL mit komplettiertem DC-Medium eingestellt. Es wurden 3 mL Zellsuspension in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte pipettiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für fünf Tage inkubiert.

4.2.1.3 Reinigung von CD4⁺-Zellen mit Hilfe des *AutoMACS*

T-Zellmedium: RPMI 1640
10% FCS
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Die PBMCs wurden auf eine Zellzahl von $1,5 - 2,0 \times 10^8$ Zellen eingestellt und mit 300 μL bis 400 μL CD4^+ -*Microbeads* in einem sterilen 15 mL-Gefäß versetzt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Miltenyi). Die positive Selektion der Zellen wurde am *AutoMACS* mit dem Programm „Possel“ durchgeführt. Aus der positiven Fraktion wurde ein Aliquot entnommen und mit PBS 1:10 verdünnt. Danach erfolgte die Zellzählung am automatischen Hämatologieanalysator KX-21N. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro 100 μL T-Zellmedium eingestellt und im T-Zell-Migrationsassay (4.2.2.5) eingesetzt.

4.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer oder mit dem Sysmex KX-21N

Die Zellzahl pro Volumen kann mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Die Zellen werden dazu in einem definierten Volumen resuspendiert und mit 0,4 %-iger Trypanblaulösung 1:3 gefärbt. Tote Zellen werden hierbei durch die Blaufärbung angezeigt, während lebende Zellen gelb leuchtend erscheinen. Es werden 10 µL dieser Mischung in die mit Hämazytometerglas dicht abgedeckte Neubauerzählkammer eingebracht.

Bei humanen Zellen kann die Zellzählung auch vollautomatisiert im Sysmex KX-21N durchgeführt werden. Dieser Messmethode liegt die Messung der unterschiedlichen

elektrischen Leitfähigkeit von Blut und Verdünnungslösung zugrunde. Außerdem wird über Vorwärtsstreuung und 90°-Streulichtmessung des eingestrahnten Lichts eine Diskriminierung der Zellpopulation vorgenommen.

4.2.1.5 Stimulation der MoDCs für die RNA-Gewinnung

Die Zellkultur wurde 5 Tage inkubiert. Am 5. Tag wurde eine Stunde vor der LPS-Stimulation 3 µL der SFA-Stammlösung (1 µM) pro Well pipettiert. Für die Kontrolle wurde 3 µL Ethanol abs. (steril) pipettiert. Nach dieser Stunde wurden in fünf Wells jeweils 3 µL LPS-Stammlösung (1 µg/mL) pipettiert. Nach 12 Stunden wurde die RNA aus jew. 5 Wells der 6-Well-Platte nach Protokoll isoliert.

4.2.1.6 RNA-Isolierung

Komplettierter RNeasy Lyse-Puffer:	10 µL 2-Mercaptoethanol
	1 mL RNeasy Lyse-Puffer

Die RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Minikit von Qiagen. Das RNeasy-Verfahren basiert auf selektiven Bindungseigenschaften von Silica-Gel-Membranen.

Nach 12-stündiger Stimulation der Zellen mit LPS wurden $1,5 \times 10^7$ humane DCs aus der 6-Well-Platte abgenommen und die Wells wurden mit PBS gewaschen und in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (250xg, 5 min) und mit 1200 µL komplettierten RNeasy Lyse-Puffer resuspendiert. Das Lysat wurde zum Homogenisieren auf eine QIAshredder-Säule pipettiert und bei 13000 min^{-1} für 2 min zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich, MIKRO 20, Tuttlingen, D). Der Durchfluss wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die homogenisierten Lysate von jeweils 4 Spendern wurden in einem 15 mL-Röhrchen vereinigt und mit 6 mL 70%-igem Ethanol versetzt. Jeweils 700 µL davon wurden hintereinander auf eine RNeasy-Säule pipettiert und bei 8000 min^{-1} 15 s zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich, MIKRO 20, Tuttlingen, D). Der Durchfluss wurde verworfen. 700 µL RNeasy-Wasch-1-Puffer wurde zum Waschen auf die Säule gegeben, zentrifugiert (8000 min^{-1} , 15 s) und der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau unter

Verwendung des RNase-Free DNase Set (Qiagen), indem 10 μL DNase I und 70 μL RDD-Puffer auf die Säule gegeben wurden und bei Raumtemperatur (RT) 15 min inkubiert wurde. Ein weiterer Waschschrift mit RNeasy-Wasch-1-Puffer folgte, nach welchem der Durchfluss und das Sammelgefäß verworfen wurden. Zum Entfernen des Ethanolts wurden 500 μL RPE-Puffer auf die Säule überführt und bei 8000 min^{-1} für 2 min zentrifugiert. Daraufhin folgte ein Trockenschritt mittels Zentrifugation (13000 min^{-1} , 1 min) unter Verwendung eines neuen Sammelgefäßes. Zur Elution der RNA von der Säule wurde ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß untergestellt, 30 μL RNase-freies Wasser mittig auf die Membran pipettiert und bei 8000 min^{-1} für 1 min zentrifugiert. Das Eluat und weitere 20 μL RNase-freies Wasser wurden ein zweites Mal auf die Membran gegeben und bei 8000 min^{-1} 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde auf Eis gelagert. 5 μL des Eluats wurden zur Konzentrationsbestimmung und Qualitätsuntersuchung der isolierten RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zum weiteren Gebrauch wurde das Eluat bei -80°C aufbewahrt. Die RNA-Ausbeute betrug 33,7 bis 113 μg .

4.2.1.7 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde jeweils 1 μL der Probe eingesetzt.

Mit Hilfe folgender Formel wurden die RNA-Konzentrationen [$\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$] errechnet:

$$RNA = Absorption_{260} * Extinktionskoeffizient * Wegstrecke \quad (4.1)$$

Der in der Literatur vermerkte Extinktionskoeffizient für RNA beträgt $40 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Die Messungen wurden bei einer Wegstrecke von 10 mm durchgeführt.

4.2.1.8 RNA-Qualitätskontrolle

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe des RNA 6000 Nano LabChips (Agilent Technologies) am Agilent 2100 Bioanalyzer am Institut für Pathologie des Uniklinikums Gießen nach Angaben des Herstellers bestimmt. Bei dieser Methode wird RNA auf einem Gel im RNA-Chip in die charakteristischen 18s und 28s RNA-Banden kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des Bandenspektrums kann durch einen internen Standard dargestellt werden, ob die vorliegende RNA intakt vorliegt oder degradiert ist.

4.2.1.9 cDNA-Oligonukleotid-Microarray

Die cDNA-Microarray-Technologie untersucht genomweite Expressionsänderungen auf Ebene der Nukleinsäuren.

Die in diesem Abschnitt beschriebene Methode sowie die statistische Auswertung der Messdaten wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Jochen Wilhelm am Institut für Pathologie des Uniklinikums Gießen durchgeführt.

Für das Microarray-Experiment wurden insgesamt 7 Spenderpools gesammelt, wobei jeweils die RNA aktivierter, mit SFA behandelter bzw. aktivierter, unbehandelter MoDCs von 4 Spendern zu einem Pool vereinigt wurden (siehe 4.2.1.6). Nach der gesamten RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und Bestimmung der RNA-Ausbeute wurde die Qualität der RNA am Agilent 2100 Bioanalyzer überprüft. Danach wurde von jeder Probe jeweils 1 µg der RNA unter Verwendung des Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers amplifiziert, in cRNA umgeschrieben und mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Hierbei wurde zunächst die RNA mit Hilfe eines Oligo dT-T7-Promoter-Primer durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. In einer T7-Polymerase-Amplifikationsreaktion wurde anschließend aus cDNA cRNA synthetisiert und gleichzeitig mit Cyanin 3- (Cy3-) oder Cyanin 5- (Cy5-) CTP (PerkinElmer) markiert. Um farbspezifische Effekte, wie z. B. durch differentiellen Farbstoffeinbau, auszuschließen und um eine statistisch relevante Datenanalyse durchführen zu können, wurde ein Farbstoffaustausch durchgeführt. Dazu wurde abwechselnd in den 7 Ansätzen einmal die mit SFA behandelte Probe und im nächsten Ansatz die unbehandelte Probe

mit Cy3-CTP markiert. Anschließend wurde die markierte cRNA der behandelten und der unbehandelten Probe eines Ansatzes vereinigt. Davon wurden 40 µg zur Hybridisierung eingesetzt. Hierzu wurde das Whole Human Genome Oligo Microarray Kit (Agilent Technologies) nach den Protokollen des Herstellers verwendet. Dieser Microarray stellt annähernd 44000 humane Gene und Transkripte dar, welche als Oligonukleotide auf 1 x 3-Zoll-Glasträger fixiert sind. Im Folgenden wurde zur Vereinfachung der Oberbegriff „DNA-Microarray“ verwendet. Das Scannen der Microarrays erfolgte mit Hilfe des DNA-Microarray-Laser-Scanners Axon 4100A GenePix. Die Spoterkennung und die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mit dem Bildanalyse-Programm Axon GenePix 5.0 Pro.

4.2.2 Biochemische und Immunologische Methoden

4.2.2.1 Stimulation der humanen DCs für die *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs)

Monozyten wurden für fünf Tage in 1000 IU/mL GM-CSF- und 1000 IU/mL IL-4-haltigen DC-Medium kultiviert. Am fünften Tag wurden entsprechende Konzentrationen Sanglifehrin A, Ethanol (Kontrolle), Cyclosporin A, Rapamycin und Dexamethason für 4 Stunden zu den Dendritischen Zellen gegeben. Anschließend wurden zwischen 3 und 9 mL Zellsuspension in ein 50 mL-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5` bei 230xg. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in komplettiertem DC-Medium resuspendiert und ein Aliquot wurde unverdünnt am Sysmex gemessen und auf 2×10^6 Zellen/mL eingestellt. Die Zellen wurden in eine 96-Well-Platte überführt und mit 100 ng/mL oder 10 ng/mL Lipopolysaccharid (LPS) oder mit 10 µg/mL Poly I:C und 20 ng/mL IFN γ stimuliert. Alle Platten wurden für 12 h bei 37°C inkubiert. Nach der 12-stündigen Inkubation erfolgte eine Zentrifugation der 96-Well-Platten und die Überstände wurden in ein neues Well überführt. Die Platten wurden bei -20°C eingefroren bis der ELISA durchgeführt werden konnte.

4.2.2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) IL-12p70, CXCL9 und CXCL10 von BD Biosciences

„Coating“-Puffer:	0,1 M Natriumcarbonat-Puffer pH 9,45
Waschpuffer für ELISA (BD Biosciences Pharmingen):	10% Dulbecco's PBS (10x) 0,05 % (v/v) Tween 20 in Milli-Q-Wasser (Millipore)

Die IL-12- und Chemokinkonzentration im Überstand der Zellkulturen wurden nach einmaligem Einfrieren mit einem Enzymimmunoassay bestimmt. Die ELISA-Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es erfolgte dabei zunächst die passive Adsorption des Primärantikörpers an die Kunststoffoberfläche einer speziellen Mikrotiterplatte bei 4°C über Nacht („Coaten“). Im anschließenden Blockierungsschritt wurden Proteine im Überschuss angeboten („Blocking-buffer“), welche die freien Bindungsstellen der Mikrotiterplatte belegten und damit die Hintergrundaktivität durch unspezifische Bindungen von Analyt und Detektionskomplex verhinderten. Das gebundene Chemokin wurde durch einen enzymmarkierten Sekundärantikörper erkannt. Das hinzugefügte Substrat wurde katalytisch gespalten, dies wurde durch einen Farbumschlag sichtbar. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion konnte das Chemokin bei einer Wellenlänge von 450 nm nachgewiesen werden. Die quantitative Auswertung erfolgte an Hand einer mitgeführten Standardreihe.

4.2.2.3 ELISA der humanen Chemokine CCL1, CCL5, CCL17 und CCL19 von R&D

„Blocking“-Puffer:	1% BSA in PBS pH 7,2-7,4
--------------------	-----------------------------

Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach Herstellerangaben. Die quantitativen Chemokinkonzentrationen konnten durch die vorhandenen Standardkurven berechnet werden.

4.2.2.4 *In vitro*-Untersuchung zur Beeinflussung der Migration von DCs

Dendritische Zellen wurden am 5. Tag für 4 Stunden mit oder ohne SFA behandelt. Die SFA-Konzentration betrug 1 μM . Die Zellen wurden nach 12-stündiger Inkubation mit LPS auf 1×10^6 Zellen pro 1mL eingestellt. Es wurden 100 μL dieser Zellsuspension in ein Transwell (Corning-Costar) mit einer Porengröße von 5 μm gegeben.

Für den Migrationsassay wurden 24-Transwell-Platten verwendet. Im unteren Teil der 24-Well-Platte wurde je 1 mL Medium mit 100 ng/mL rekombinantes humanes CCL19 bzw. als Negativkontrolle nur Medium ohne Chemokin vorgelegt. Außerdem wurde 1 mL Überstand von einer Kultur Dendritischer Zellen vorgelegt, die mit oder ohne SFA und LPS behandelt wurden. Die SFA-Konzentration betrug auch hier 1 μM . Als zusätzliche Kontrolle wurde der Überstand aus Trägersubstanz-behandelten Zellen verwendet, zu diesem Überstand wurde 1 μM SFA hinzugefügt. Diese zusätzliche Kontrolle diente dazu den direkten Einfluss von SFA auf die migrierenden Zellen zu kontrollieren.

Die Transwells wurden auf die unteren Wells gesetzt und für 4 Stunden bei 37 °C in 5 % CO_2 inkubiert. Nach 4 Stunden wurde die Membran entnommen. Das Medium wurde aus dem unteren Well gut durchmischt und 100 μL für die Zählung der gewanderten Dendritischen Zellen wurde daraus entnommen. Für die Zählung der Zellen wurde das Leukocount-Kit von BD Biosciences verwendet. Die Durchführung des Versuchs ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt.

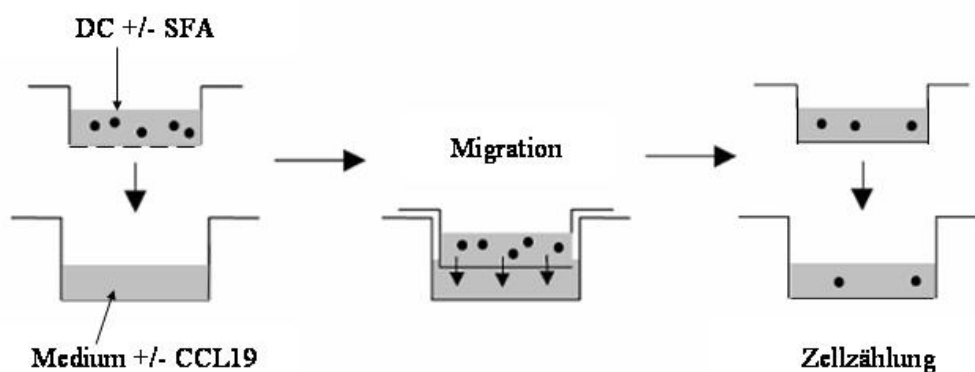


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung eines Migrationsassays für Dendritische Zellen. Zellen in der oberen Kammer wandern durch eine poröse Membran in eine untere Kammer, die das Chemokin enthält. Danach werden die Zellen in der unteren Kammer gezählt.

4.2.2.5 *In vitro*-Untersuchung der Migration von T-Lymphozyten

100 μL einer 1×10^7 CD4^+ -T-Zellen/mL-Suspension wurden in das obere Transwell der 24-Well-Chemotaxis-Platte mit einer Porengröße von 5 μm gegeben. In das untere Well wurde je 1 mL Medium mit 100 ng/mL rekombinantes humanes (rh) CCL19, rh CCL17 oder rh CCL5 bzw. als Negativkontrolle nur Medium ohne Chemokin vorgelegt. Außerdem wurde 1 mL Überstand von einer Kultur Dendritischer Zellen vorgelegt, die mit oder ohne SFA und LPS behandelt wurden. Die SFA-Konzentration betrug auch hier 1 μM . Als zusätzliche Kontrolle wurde der Überstand aus Trägersubstanz-behandelten Zellen verwendet, zu diesem Überstand wurde 1 μM SFA hinzugefügt. Diese zusätzliche Kontrolle diente dazu den direkten Einfluss von SFA auf die migrierenden Zellen zu kontrollieren. Die Migration der T-Zellen wurde für 4 h bei 37 °C in 5 % CO_2 erlaubt. Anschließend wurden aus dem unteren Well die migrierten Zellen entnommen und die Zellzahl wurde mit dem Leukocount-Kit von BD Biosciences detektiert.

4.2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescent activating cell sorting* oder *fluorescent activating cell scanning*)

4.2.2.6.1 Direkte und Indirekte Färbung von Oberflächenmarkern Dendritischer Zellen und T-Zellen

PBS-Azid:	1x PBS
	0,1% Natriumazid

Das Durchflusszytometer misst und analysiert verschiedene physikalische Eigenschaften einzelner Partikel, gewöhnlich Zellen, in einem Flüssigkeitsstrom. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen oder Partikel durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Merkmale, die gemessen werden, sind die relative Partikelgröße, die relative Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität. Diese Eigenschaften werden durch ein gekoppeltes optisch-elektronisches System bestimmt,

das ermittelt, wie die Zelle oder Partikel das einfallende Laserlicht streut und die Fluoreszenzen emittiert.

Die Zellsuspension wurde auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen eingestellt. Zu den Zellen wurden 2,5-10 μL primärer Antikörper gegeben und für 15 Minuten im Dunklen auf Eis stehengelassen. Nach dieser Inkubationszeit wurde die mit Antikörper versetzte Zellsuspension mit 1 mL PBS-Azid gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 300 μL Cellfix oder PBS aufgenommen und innerhalb von 24 Stunden am Durchflusszytometer FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen.

Die indirekte FACS-Färbung wurde für den IL-1RII-unkonjugierten Antikörper durchgeführt, dafür wurden 400 μL Zellen (1×10^6 Zellen/mL) mit 2,5 μL IL-1RII-Antikörper versetzt. Die Ansätze wurden gut gemischt und 20' auf Eis im Dunklen stehengelassen, danach wurden 2 mL PBS-Azid zu den Ansätzen gegeben und zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und 2,5 μL des PE-markierten sekundären Antikörpers wurden auf das Pellet gegeben, gemischt, und 20 Minuten auf Eis im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 mL PBS-Azid hinzugefügt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Danach wurden je 2,5 μL primäre CD14-FITC- und CD1a-APC-Antikörper hinzu gegeben, die Inkubation und Waschvorgang wurden wiederholt. Das Pellet wurde anschließend in 300 μL Cellfix aufgenommen und am Durchflusszytometer (FACSCalibur) gemessen.

Die Darstellung der Daten erfolgte als Punktwolken, in der eine Zelle, entsprechend ihrer Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität, durch einen Punkt repräsentiert wird. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms WinMDI, Version 2.8 oder mit Weasel, Version 2.

4.2.2.6.2 *Leukocount*-Kit

Für die Zählung der gewanderten Zellen des *in vitro* Chemotaxis-Assays wurde das *Leukocount*-Kit, das für die Zählung geringer Zellzahlen konzipiert wurde, verwendet. Das *Leukocount*-Kit enthält Propidiumiodid. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäurefarbstoff, der bei Verwendung von RNase selektiv zelluläre DNA färbt. Leukozyten sind kernhaltige Zellen, die somit vom Farbstoff gefärbt werden. Nicht-kernhaltige Partikel werden durch dieses Reagenz nicht gefärbt. Im Kit enthalten sind spezielle *Truecount*-Röhrchen. Diese Röhrchen enthalten Beads, die als interne Referenz für die genaue Bestimmung der absoluten Anzahl der Leukozyten verwendet werden. Die Erfassung der Leukozyten erfolgt mittels Durchflusszytometrie.

100 µL der gewanderten Dendritischen Zellen oder T-Zellen wurden in ein *Truecount*-Röhrchen, das mit einem intakten Pellet (*Beads*) versehen war, pipettiert. Danach wurde das Zell/*Bead*-Gemisch mit 400 µL Propidiumiodid versetzt und nach einer 5-minütigen Inkubation im Dunklen wurde der Ansatz am FACSCalibur gemessen. Die Anzahl der migrierten Leukozyten konnte mit folgender Formel 4.1 bestimmt werden:

$$\frac{\text{Ereignisse}}{\text{Beadereignisse}} \times \frac{\text{chargenspezif.Partikelzahl}}{\text{Vol.d.gefärbten Probe}} = \frac{\text{abs. Anzahl d. Leukozyten}}{\mu\text{L}} \quad (4.1)$$

Die Absolute Anzahl der Leukozyten/Ansatz errechnet sich durch Multiplikation der absoluten Anzahl der Leukozyten/µL mit 1000.

4.2.3 Tierexperimentelle Methoden

4.2.3.1 Präparation des Inguinal-Lymphknotens aus der Maus

8-bis 12-Wochen alte C57BL/6NCrl-Mäuse wurden für diese Versuche verwendet. Die Mäuse wurden mittels Isofluran eingeschläfert und mit Präpariernadeln auf der Unterlage fixiert. Der Bauchraum wurde mit einem Desinfektionsmittel desinfiziert und mit Hilfe einer Schere entlang der *linea alba* eröffnet. Die Inguinal-Lymphknoten (Lnn. *inguinales superficiales*) liegen unter der Haut im Bereich des äußeren Leistenrings im Fettgewebe der Unterhaut. Die rundlichen Lymphknoten wurden aus dem Fettgewebe entnommen.

4.2.3.2 Leukozyten-Isolierung aus dem Lymphknoten der Maus

Die isolierten Inguinal-Lymphknoten wurden in eine Petrischale gelegt, die mit HBSS (3 mL) gefüllt war. Die Lymphknoten wurde mit einer scharfen Schere zerkleinert und das gesamte Material wurde durch ein Zellsieb (30 µm) mit Hilfe eines Stößels gepresst, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die Zellen wurden in einem 15 mL-Gefäß gesammelt und durch die Zugabe von RBC-Lysis-Puffer mit einem Endvolumen von 14 mL gewaschen. Die Erythrozyten wurden durch den Puffer entfernt. Nach dem Zentrifugieren wurde die Zellsuspension in 1mL HBSS aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

4.2.3.3 Messung der *in vivo*-Migration von DCs mit Hilfe der „FITC-Painting“-Methode

Trägersubstanz:	2,5 % Polysorbat 80
	51 % Polyethylenglycol 300
	46,5 % steriles Wasser

8-bis 10-Wochen alte C57BL/6NCrI-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, D) bezogen und in der Tierhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes gehalten.

Eine physiologische Migration von *in vivo* DCs kann durch die „FITC-Painting“-Methode beobachtet werden. Die C57BL/6NCrI-Tiere wurden für 5 Tage mit 5 mg/d/KG SFA behandelt. Tiere, die zur Kontrolle dienten, wurden für 5 Tage mit der Trägersubstanz i.p. injiziert. Nach diesen fünf Tagen wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und das Abdomen wurde geschert. Auf das rasierte Abdomen wurde 200 µL gelöstes FITC Isomer I (5 mg/mL) in 50:50 (vol:vol) Aceton:Dibutylphthalat gegeben. Die Hintergrundkontrollen (Eigenfluoreszenz) der FACS-Ergebnisse wurden mit Tieren durchgeführt, die das Aceton:Dibutylphthalat-Gemisch ohne FITC erhalten hatten.

Nach weiteren 4, 8 und 24 Stunden wurden Milz und Inguinal-Lymphknoten isoliert und eine Zellsuspension wurde hergestellt. Durch die „FITC-Painting“-Methode sind Zellen mit FITC markiert worden. Um Dendritische Mauszellen spezifisch zu detektieren, wurden die Zellen mit APC-markierten CD11c⁺-Antikörper gefärbt. Die doppelt positiven Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen (4.2.2.6).

5 Ergebnisse

5.1 cDNA-Microarray

Globale Studien stellen Möglichkeiten dar, Erkenntnisse für das Verständnis der komplexen funktionellen Mechanismen im Organismus und Geweben zu sammeln. Die Untersuchung zellulärer Prozesse auf verschiedenen molekularen Ebenen erlaubt es, Zusammenhänge und Einflüsse von regulatorischen Faktoren und deren Verknüpfungen besser zu verstehen und einzuschätzen.

In dieser Studie wurden humane „*monocyte-derived Dendritic Cell*“ (MoDC) verwendet, die mit dem relativ neuen Immunsuppressivum Sanglifehrin A (SFA) behandelt wurden. Nach einer 12-stündigen Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) wurde die RNA aus den mit SFA-behandelten und Trägersubstanz-behandelten Zellen isoliert. Die RNA wurde auf Intaktheit überprüft und von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Wilhelm, Inst. f. Pathologie, im cDNA-Microarray eingesetzt und statistisch ausgewertet. Die Rohdaten wurden Hintergrund-korrigiert und nach Holm, mit $p < 0,05$, ausgewertet. Die Daten werden in Abbildung 5.1 als „Volcano-Plot“ dargestellt.

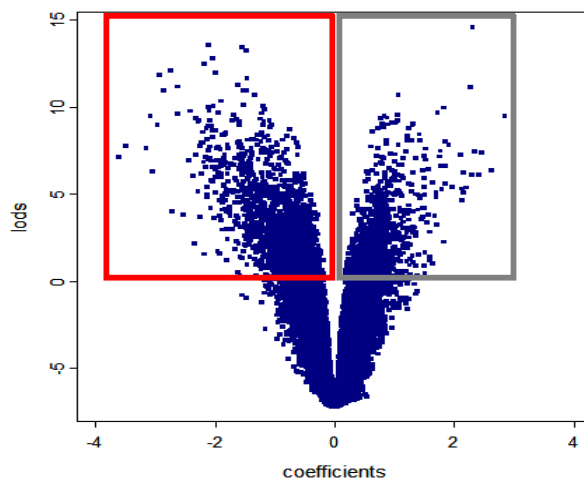


Abbildung 5.1 Volcano-Plot-Darstellung der Microarray-Daten. Hintergrund-korrigiert und nach Holm ausgewertet. Herunterregulierte Gene (rote Markierung) und hochregulierte Gene (graue Markierung) sind durch eine Umrandung hervorgehoben.

Hierbei werden die Koeffizienten gegen die Lods (= *log odds-ratio*) aufgetragen. Der Koeffizient gibt an, wie stark ein Gen durch SFA im Vergleich zur Genexpression der Kontrolle reguliert wird. Bei einer Hochregulation der Genexpression werden positive, bei einer Regulation nach unten negative Werte erhalten. Die Größe des Betrags zeigt die Stärke der Regulation an. Lods ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem positiven Testergebnis das Gen reguliert vorliegt, d.h. Lods stellen den Logarithmus des Chancenverhältnisses von regulierten zu unregulierten Genen dar. Bei Werten größer als Null ist es wahrscheinlich, dass diese Gene eher reguliert als unreguliert sind. Denn unter der Annahme, dass etwa 0,1 % der untersuchten 44000 Gene in Wahrheit reguliert sind ($p < 0,05$), bedeutet ein Lods von Null eine gleichgroße Wahrscheinlichkeit, dass das Gen reguliert bzw. nicht reguliert ist.

Der dargestellte „Volcano-Plot“ zeigt in einem grau-markierten Bereich durch SFA hochregulierte Gene mit Koeffizienten und Lods größer Null sowie rot markiert runterregulierte Gene mit einem Koeffizienten kleiner Null und positiven Lods. Hier zeigt sich deutlich, dass der größere Anteil der wahrscheinlich regulierten Gene durch SFA nach unten reguliert wurde. Bei allen nicht-markierten Genen wurden Lods kleiner als Null erhalten. Diese Gene werden mit höherer Wahrscheinlichkeit nicht reguliert.

Nach der ermittelten statistischen Auswertung können 260 Gene als signifikant reguliert identifiziert werden. Von diesen Genen waren 190 Gene signifikant herunterreguliert, während 70 Gene hochreguliert wurden.

Eine „*Pathway*“-Analyse wurde *in silico* mit dem Programm „PathwayExpress“ von „OntoExpress“ (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress/> letzter Zugriff: Juni 2006) durchgeführt. Das Programm ermöglicht die Zuordnung regulierter Gene zu ihren biologischen Funktionen als Proteine. Die meisten der regulierten Gene sind auf funktionaler Ebene in immunologisch relevanten Signaltransduktionswegen zu finden. Die möglicherweise involvierten Signalwege der möglichen regulierten Proteine nach Sanglifehrin A-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten Zellen sind in der Abbildung 5.2 dargestellt. Die Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion (Impaktfaktor 39,8), MAPK- und der Jak-STAT-Signalweg zeigten die meisten Überschneidungen mit den Proteinen der regulierten Genen. Mit einem niedrigeren Impaktfaktor von 9,4 waren außerdem einige der Proteine der regulierten Gene in den *Toll-like*-Rezeptor-Signalweg involviert.

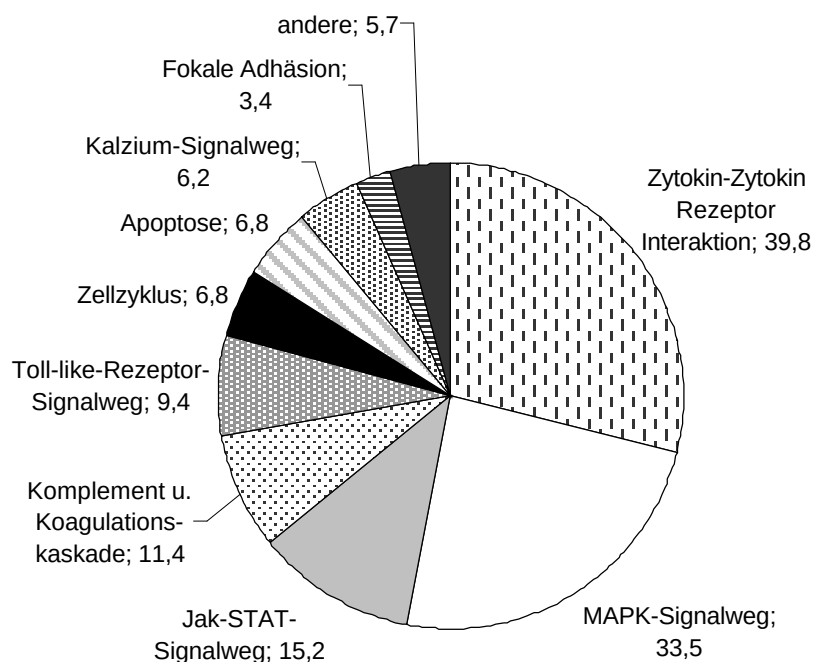


Abbildung 5.2 In silico-Zuordnung signifikant regulierter Gene zu ihren biologischen Funktionen als Proteine nach Sanglifehrin A-Behandlung im Vergleich mit Trägersubstanz-behandelten Zellen mit Hilfe des Programms „PathwayExpress“ von „OntoExpress“.

Die Ergebnisse des cDNA-Microarrays sind in der *Gene expression omnibus* (GEO)-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) mit der Zugriffsnummer: GSE15956 veröffentlicht. Die Liste der gesamten signifikant regulierten Gene ist im Anhang 9.1 angefügt. Die folgende Tabelle (Tabelle 5.1) zeigt die regulierten Gene, die in dieser Studie auf Proteinebene bestätigt werden sollten. Hierzu gehören einige Chemokine, CD38 und IL-1RII. Das Chemokin CCL19 war mit einem Koeffizienten von -3,61 das am Stärksten runterregulierteste Gen aller signifikanten 260 Gene.

Tabelle 5.1 Systematischer Name, Synonym, Regulation und statistische Daten ausgewählter signifikanter Gene aus den Microarray-Ergebnissen, sortiert nach Lods (n=28).

systematischer Name	Synonym	Regulation	Koeffizient	p-Wert	lods
CCL5	RANTES	runter	-2,92	1,78E-09	11,8
CCL17	TARC	runter	-2,41	4,89E-09	9,76
IL-1RII	CD121b,IL1RB	hoch	2,84	3,78E-08	9,48
CXCL9	MIG	runter	-2,96	6,92E-08	8,94
CD38	Cyclic ADP-ribose hydrolase	runter	-2,21	1,06E-07	8,54
CCL1	I-309	hoch	2,47	3,66E-07	7,36
CCL19	MIP-3 β , ELC, exodus-3	runter	-3,61	4,61E-07	7,14
CXCL10	IP-10	runter	-1,27	7,6183E-05	1,88

5.2 *in vitro*-Proteinexpressionen

Proteinexpressionen unterliegen einem dynamischen Prozess und können durch verschiedene Parameter beeinflusst werden. Das empfindliche Gleichgewicht des Proteinaufbaus und -abbaus kann durch verschiedene Stoffwechsel- oder Umgebungsbedingungen sehr unterschiedlich sein. Es besteht keine strikte Korrelation zwischen der Menge an mRNA und der dazugehörigen Proteinmenge. Translationsregulation, mRNA-Stabilität und Proteinstabilität können bei einer mRNA-Analyse nicht erfasst werden und verhindern somit eine Aussage über die tatsächlich vorhandene Proteinmenge, dies macht eine Protein-Analyse unabdingbar.

5.2.1 IL-1sRII-Proteinexpression bei humanen Dendritischen Zellen

Der membraninsetzte IL-1RII agiert als *Decoy*-Rezeptor, der die Aktivität seiner Liganden inhibiert. Zu seinen Liganden zählen IL-1 α und IL-1 β . Der IL-1RII in seiner membrangebundenen-Form ist 60 – 68 kDa groß, während seine lösliche-Form eine Größe von 47 kDa aufweist. Auf Genebene wurde die Expression von IL-1RII hochreguliert, was sich aber durch Überprüfung der löslichen-Form und membraninsetzten-Form der IL-1RII-Expression auf Proteinebene nicht bestätigen ließ. Die quantitativen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines ELISAs durchgeführt (Abbildung 5.3). Im Vergleich der eingesetzten Immunsuppressiva erhöhte Dexamethason als einziges Immunsuppressiva die IL-1sRII-Expression. Die Analyse der Oberflächenexpression von IL-1RII mit Hilfe der Durchflusszytometrie ergab eine IL-1RII-Oberflächenexpression von 64,8 % der Kontrolle und eine Expression von 60,1 % IL-1RII für SFA-behandelte Dendritische Zellen.

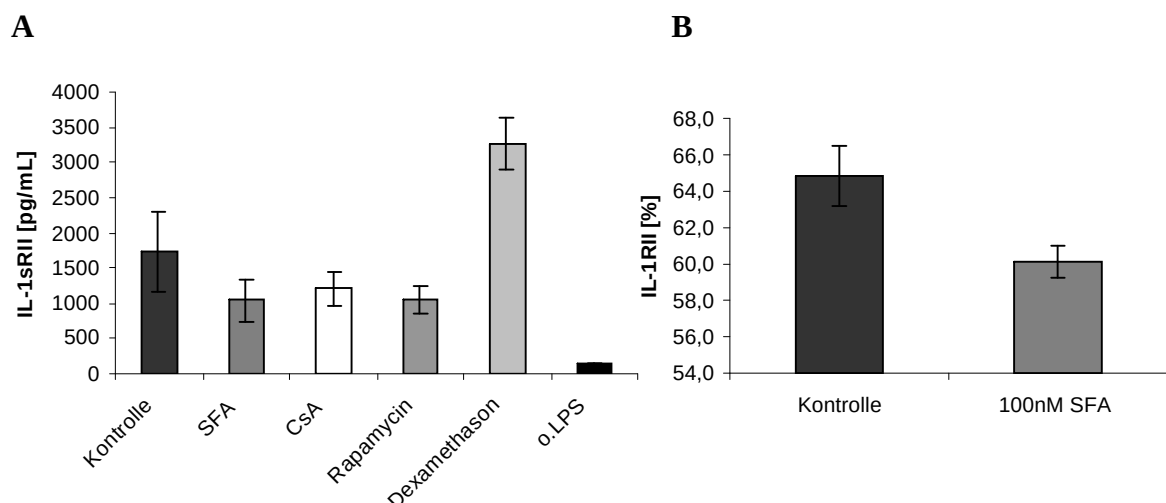
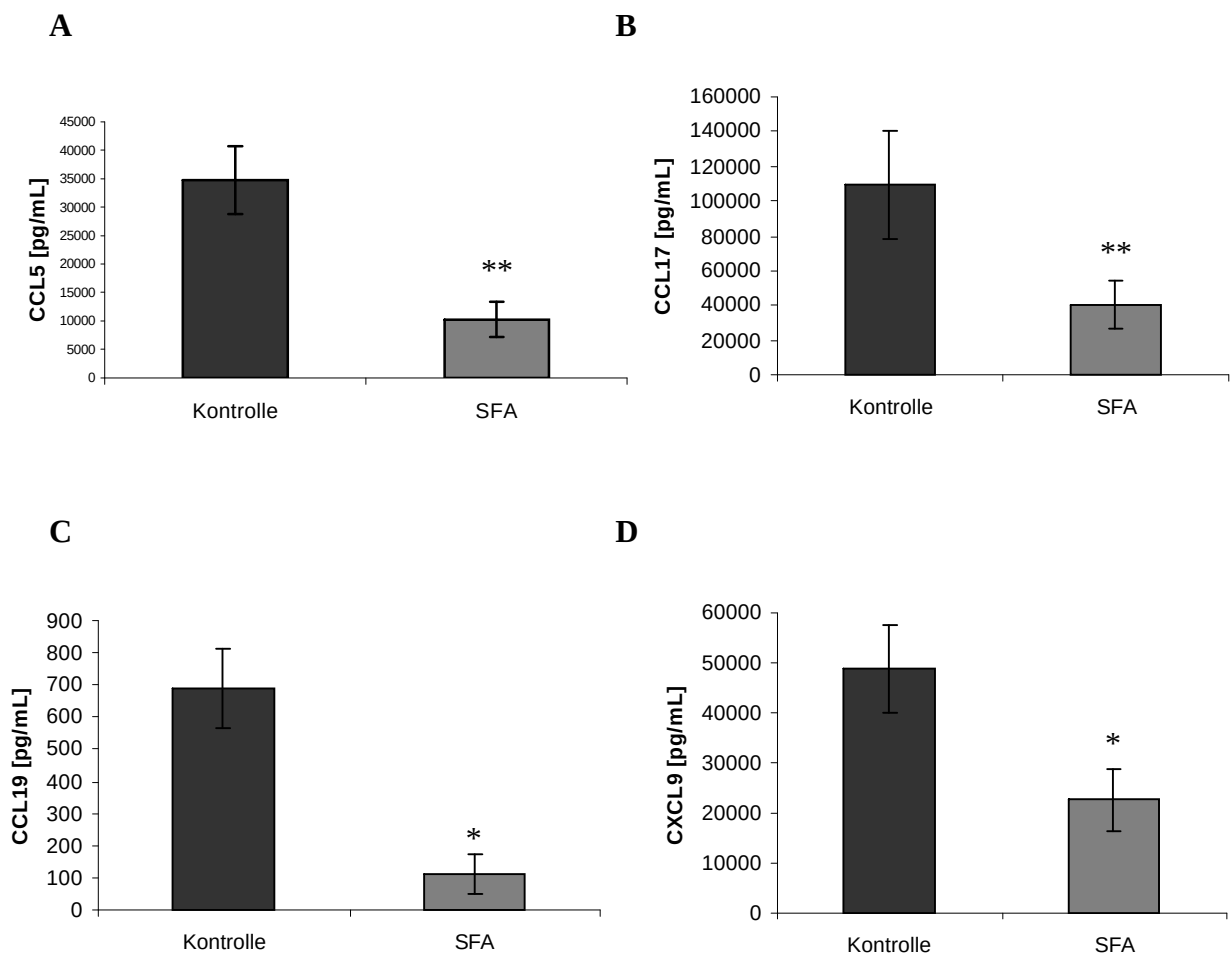


Abbildung 5.3 Keine signifikante Änderung der Proteinexpression der löslichen- und membraninsetzten-Form des IL-1RII von Dendritischen Zellen nach Behandlung der Zellen mit SFA. **A)** IL-1sRII-Expression nach Behandlung der DCs mit den jeweiligen Immunsuppressiva mit 100 nM für 4 Stunden und anschließender zwölfstündiger LPS-Stimulation. **B)** IL-1RII-Expression von DCs nach SFA-Behandlung und 24-stündiger 100 ng/mL LPS-Stimulation. Die Daten (A und B) repräsentieren die Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert $\pm$ SEM). Statistik: Wilcoxon.

5.2.2 Sanglifehrin A supprimiert die CCL5-, CCL17-, CXCL9-, CXCL10- und CCL19-Produktion humaner Dendritischer Zellen auf Proteinebene

Die Expression der zumeist runterregulierten Gene der Chemokine wurde auch auf Proteinebene überprüft. Hierfür wurde bei *in vitro*-Studien die quantitative Methode des ELISAs gewählt. CXCL10 wurde mit durchschnittlich 105 ng/mL in der Kontrollgruppe produziert, wohingegen nur CCL17 mit einer durchschnittlichen Produktion von 110 ng/mL eine höhere Protein-Produktionsrate erzielen konnte (Abbildung 5.4 E & B). Dendritische Zellen, die mit der Trägersubstanz behandelt wurden, zeigten eine vergleichsweise geringe Absolutproduktion von durchschnittlich 689 pg/mL CCL19 an. Dagegen exprimierten die mit Sanglifehrin A behandelten humanen DCs nur noch 110 pg/mL CCL19 (Abbildung 5.4 C). CCL1 wurde auf Genebene hoch reguliert, dies ist auf Proteinebene nicht zu bestätigen. Die anderen Chemokine wurden sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene runterreguliert (Abbildung 5.4).



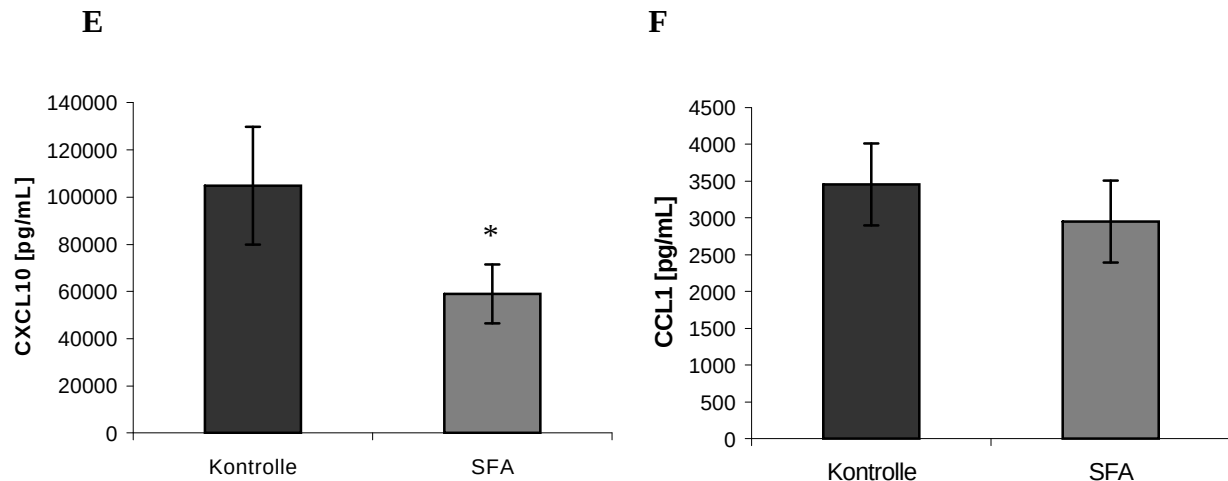


Abbildung 5.4 Inhibition der CCL1-, CCL5-, CCL17-, CCL19-, CXCL9/10-Produktion von humanen DCs, die für 4 h mit 100 nM SFA und danach mit 100 ng/mL LPS für 12 h behandelt wurden. **A** CCL5 n=11, **B** CCL17 n=11, **C** CCL19 n=8, **D** CXCL9 n=6, **E** CXCL10 n=7 und **F** CCL1 n=7 unabhängige Experimente. Es wurden die Mittelwerte $\pm$ SE angegeben. Statistik: Wilcoxon, ** $P < .01$, * $P < .05$ vs. Kontrolle

Die erfolgreiche CCL19-Suppression nach erfolgter SFA- und LPS-Behandlung wurde zusätzlich für die Stimulation mit Poly I:C und $\text{IFN}\gamma$ für das Chemokin CCL19 überprüft. In Abbildung 5.5 kann die Hemmung der CCL19-Produktion dosisabhängig nach Poly I:C/ $\text{IFN}\gamma$ - und SFA-Behandlung in Bezug zur Kontrolle nachvollzogen werden.

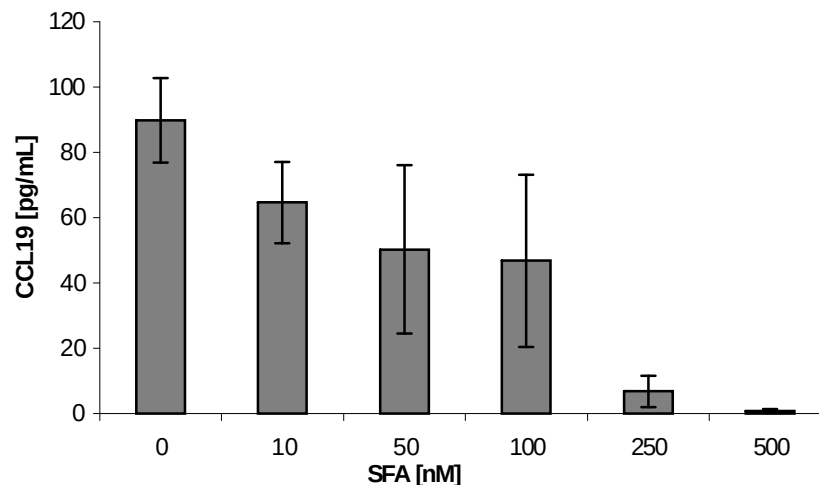
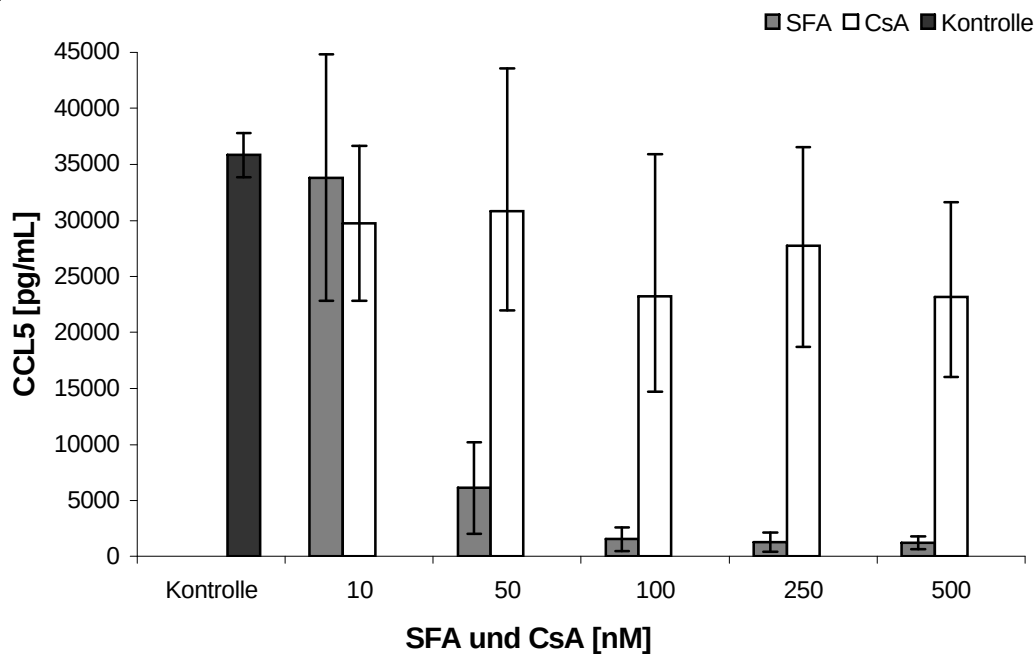


Abbildung 5.5 Konzentrationsabhängige Reduktion der CCL19-Freisetzung durch SFA bei Poly I:C und $\text{IFN}\gamma$ stimulierten humanen DCs. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit den entsprechenden Konzentrationen SFA und Trägersubstanz behandelt und danach für 12 Stunden stimuliert. Es wurden 4 unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte wurden mit dem Standardfehler aufgetragen.

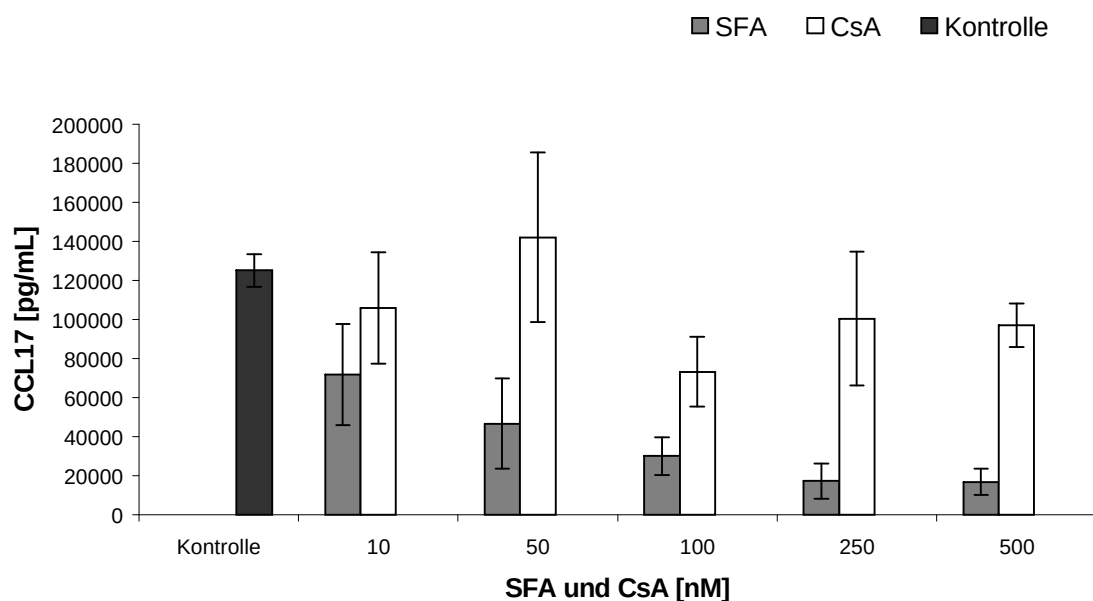
5.2.3 Dosisabhängigkeit der Chemokinproduktion nach SFA-Gabe

Die Chemokinexpression wurde in Dendritischen Zellen nach Gabe von Sanglifehrin A oder Cyclosporin A in unterschiedlichen Dosen gemessen, um eine Dosisabhängigkeit der Expression von CCL19, CCL17 und CCL5 zeigen zu können (Abbildung 5.6). Cyclosporin A zeigte bei allen drei untersuchten Chemokinen keine dosisabhängigen Effekte. Die Aktivität von CsA wurde zuvor getestet und kann für diesen Versuch gewährleistet werden.

A



B



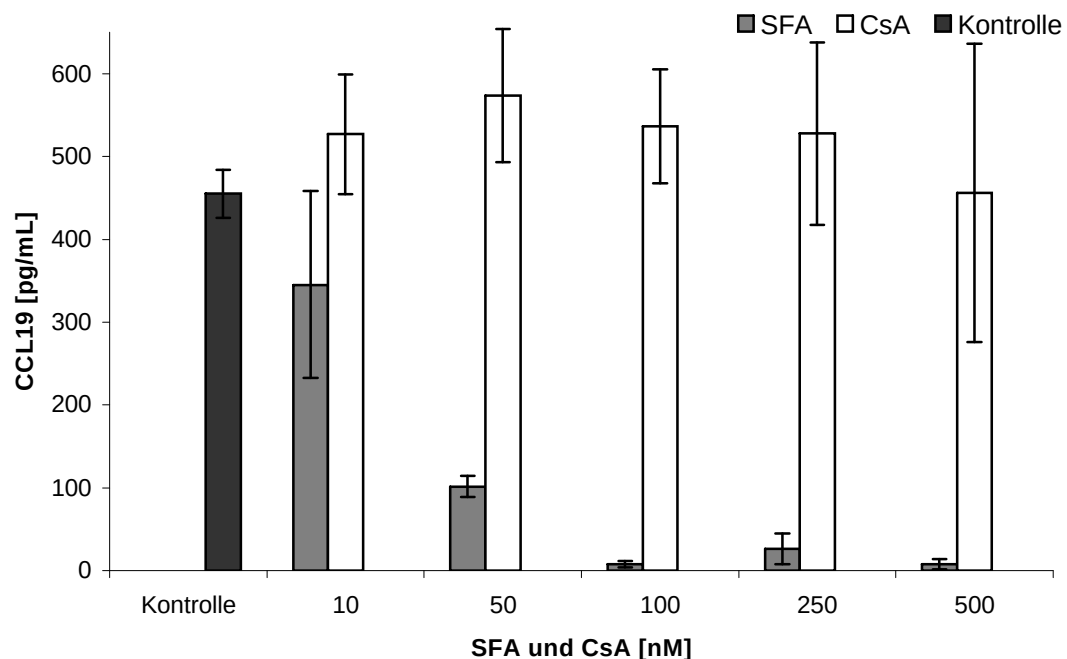
C

Abbildung 5.6 Dosisabhängige Suppression von CCL5 (A), CCL17 (B) und CCL19 (C) nach Sanglifehrin A-Behandlung im Vergleich zur Trägersubstanz- und Cyclosporin A-behandelten humanen DCs. Die humanen DCs wurden für 4 h mit den jeweiligen Dosen an SFA und CsA und Trägersubstanz behandelt und danach mit 100 ng/mL LPS für 12 stimuliert. Es wurden 4 (A) und 3 (B&C) separate Experimente durchgeführt.

5.2.4 Die Effekte von Sanglifehrin A im Vergleich mit anderen Immunsuppressiva

Die Wirkung des Immunsuppressivums Sanglifehrin A auf die Produktion der Chemokine wurde mit den bekannten Immunsuppressiva Cyclosporin A, Rapamycin und Dexamethason verglichen, um die Selektivität der Inhibition durch SFA feststellen zu können. Es konnte dargestellt werden, dass mit Sanglifehrin A-behandelte Zellen eine erhöhte Chemokinsuppression zeigten, im Vergleich zu CsA und Dexamethason. Rapamycin offenbarte bei CCL5, CCL19 und CXCL10 eine vergleichbare Inhibition der Chemokinexpression wie SFA. Während Inhibitionen der anderen untersuchten Chemokine (CCL17 und CXCL9) durch Rapamycin weniger beeinflusst scheinen als durch SFA-behandelte Zellen. Nur SFA zeigte bei allen untersuchten Chemokinen eine Chemokinsuppression (Abbildung 5.7).

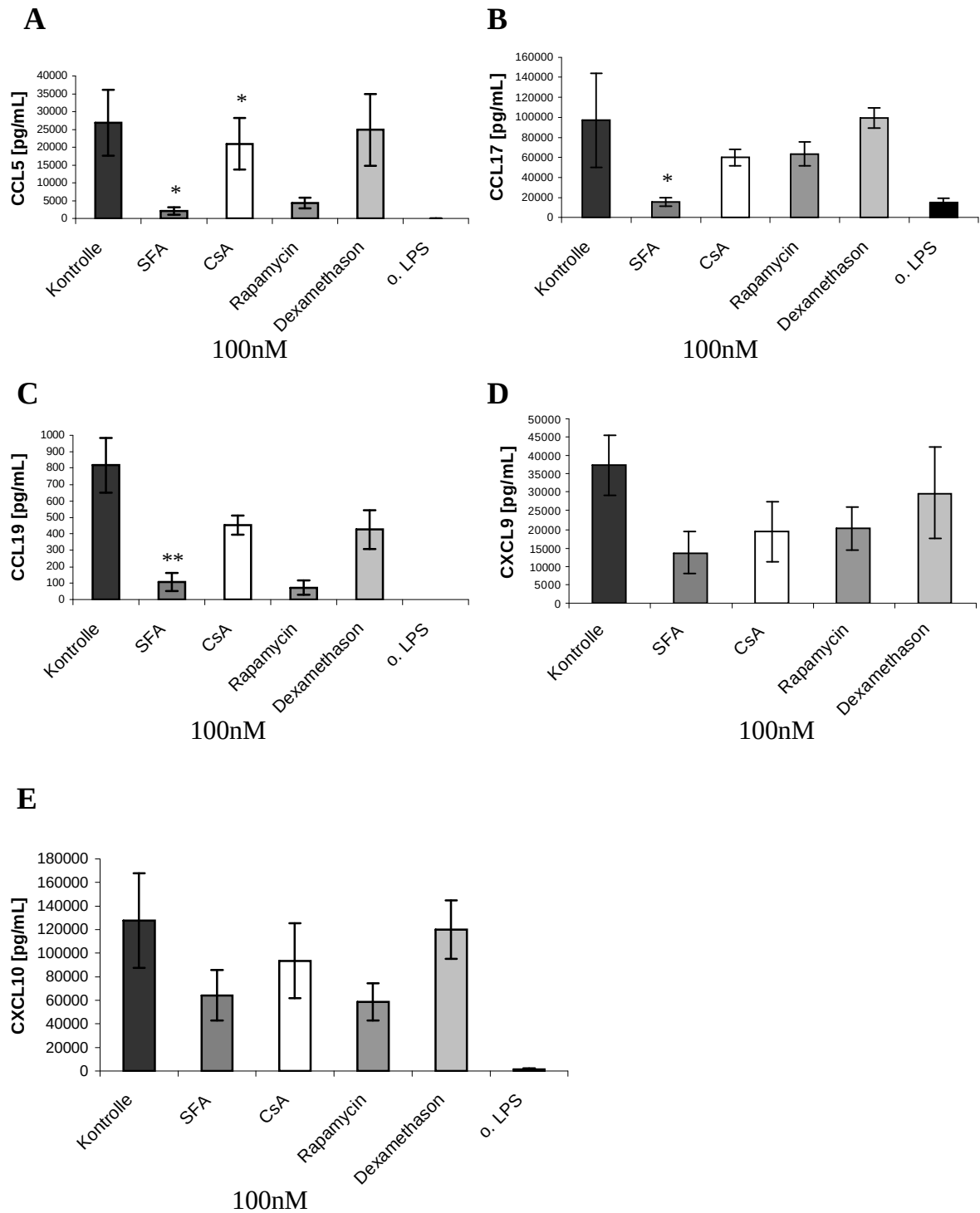


Abbildung 5.7 SFA ein neuer CCL5, CCL17, CCL19, CXCL9 und CXCL10 Inhibitor. CCL5- (A), CCL17- (B), CCL19- (C), CXCL9- (D) und CXCL10- (E) Expressionsänderungen nach Behandlung humaner DCs mit 100nM SFA, 100nM CsA, 100nM Rapamycin und 100nM Dexamethason für 4 h und anschließender Stimulation mit LPS (100 ng/mL für 12 h). Es wurden für A 5, B 4, C 6, D&E 4 unabhängige Daten erhoben (Mittelwerte $\pm$ SEM). Statistik: Wilcoxon, ** $P < .01$, * $P < .05$ vs. Kontrolle

5.2.5 Konkurrenz von SFA und CsA

Um abzuschätzen, ob die Suppression der Chemokine abhängig von der SFA-Bindung zu Cyclophilin ist, wurden kompetitive Experimente mit SFA und einem molaren Überschuss an CsA durchgeführt (Abbildung 5.8). Nach einer Behandlung der humanen DCs mit 100 nM SFA wurden alle drei Chemokine supprimiert. Bei allen untersuchten Chemokinen (CCL5, CCL17 und CCL19) konnte eine verstärkte Suppression durch die Vorinkubation von 10 μ M CsA und einer 4-stündigen SFA-Behandlung erreicht werden. Eine suprapharmakologische-Konzentration von CsA allein verminderte die Expression des Chemokins CCL19 nur bedingt und zeigte keine Wirkung auf die Chemokinexpression bei CCL5 und CCL17 im Vergleich zu Trägersubstanz-behandelten Zellen (max. Endkonzentration von Ethanol: 0,98%).

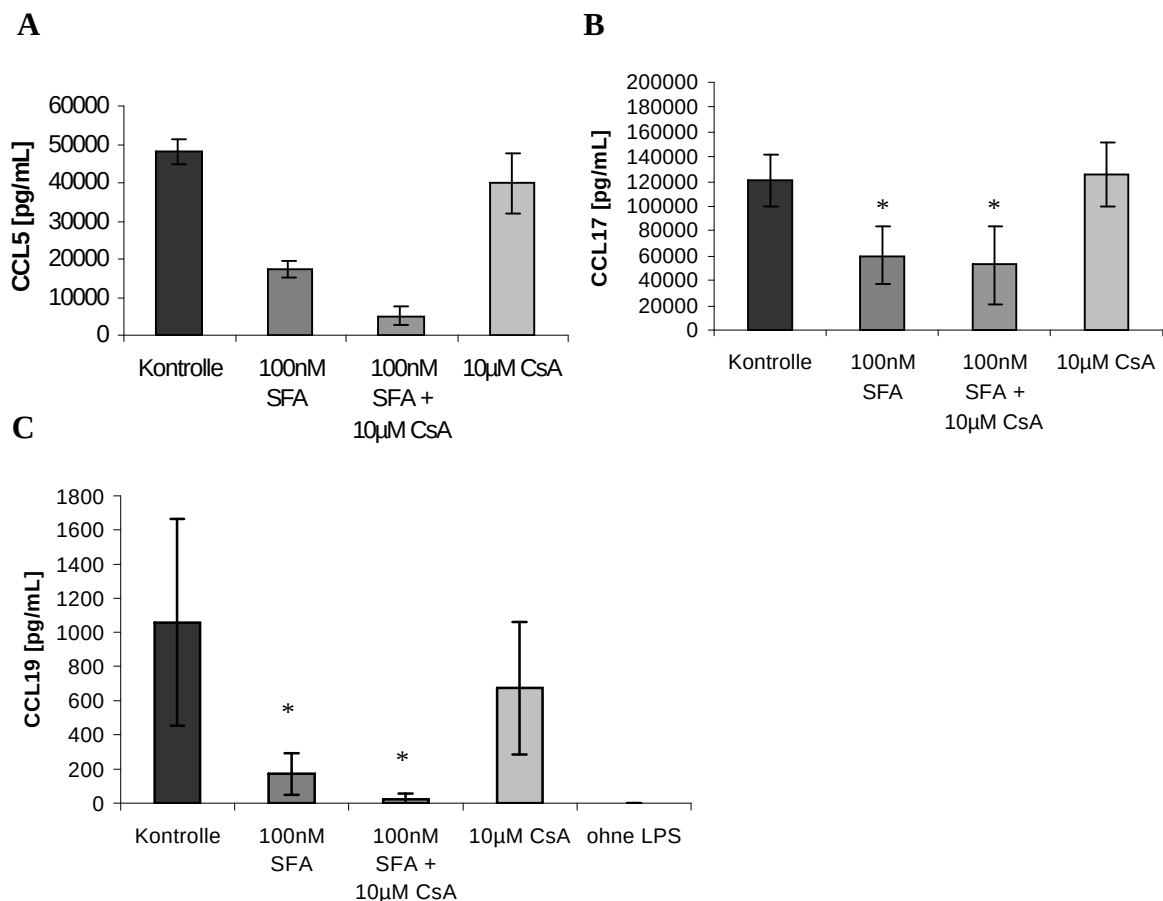


Abbildung 5.8 Inhibition der Chemokinproduktion nach kombinierter Gabe von SFA und CsA. Die kompetitiven Experimente, SFA, CsA und SFA nach einer einstündigen Vorinkubation von 10 μ M CsA, wurden vor der vierstündigen Stimulation mit LPS für 12 h verabreicht. Es wurden für A 5-6 unabhängige Experimente durchgeführt, für B 4-6 und für C 6 separate Experimente. Die Säulen geben den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung an. Statistik: Wilcoxon, * $P < .05$

5.2.6 Sangliefhrin A inhibiert die Migration Dendritischer Zellen zu CCL19 - CCR7-unabhängig

Eine wichtige Eigenschaft von Chemokinen ist es, Zellen zur Migration anzuregen. Diese Funktion kann *in vitro* mit Hilfe eines Chemotaxis-Assays nachvollzogen werden. Dendritische Zellen wurden mit Sangliefhrin A oder Trägersubstanz behandelt. Diese Zellen wurden in die obere Kammer einer Transwell-Platte gegeben, damit die Zellen durch die Poren des Transwells wandern konnten. In die untere Vertiefung wurden Medium und ein Chemokin vorgelegt. Es wanderten weniger humane DCs die mit Sangliefhrin A behandelt wurden zu dem Chemokin CCL19, im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.9 A). Außerdem war die Migration von Sangliefhrin A behandelten Zellen eingeschränkt, wenn als Chemoattraktant das Chemokin CCL17 verwendet wurde (Abbildung 5.9 B).

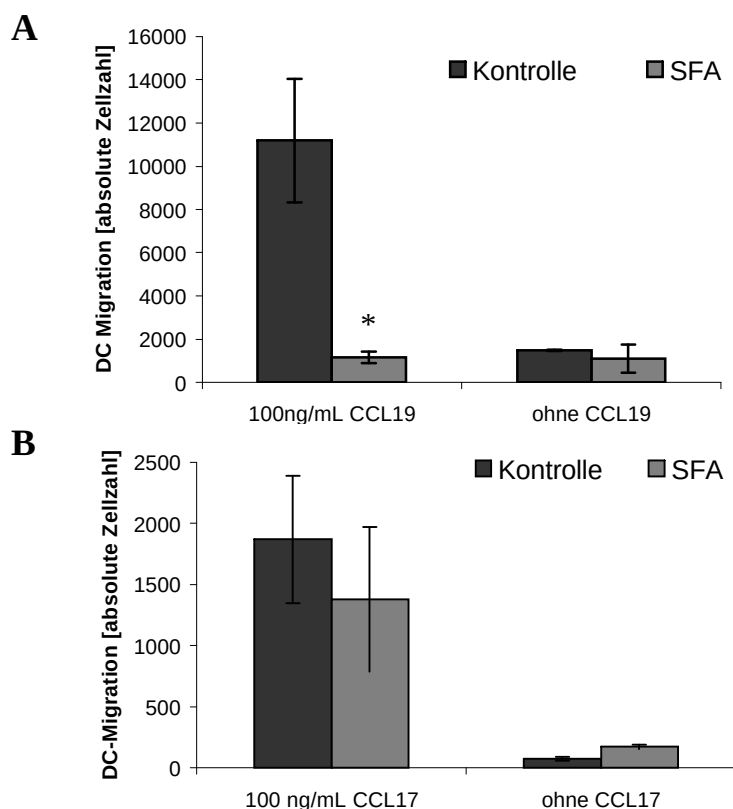
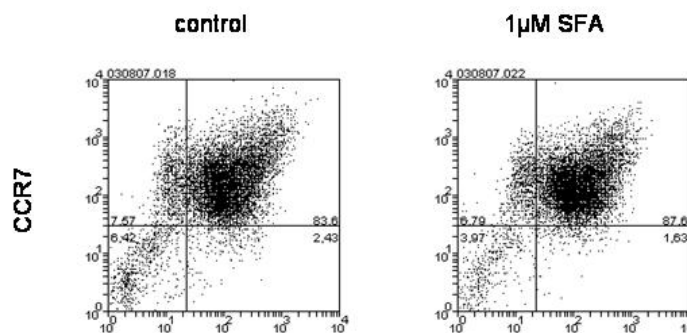


Abbildung 5.9 Inhibition der *in vitro*-Migration von aktivierten Sangliefhrin A-behandelten humanen DCs zu den Chemokinen CCL19 (A) und CCL17 (B). Die ungerichtete Wanderung der Zellen (Chemokinese) wurde als Kontrolle mitgeführt. Dafür wurde in das untere Well nur Medium (ohne Chemokin) vorgelegt. Es wurden für A von l.n.r. 6, 7, 3 und 6 unabhängige und für B 3 unabhängige Experimente durchgeführt (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Statistik: * $P < .05$ vs. Kontrolle Wilcoxon.

Die Chemokine CCL19 und CCL21 sind Liganden für den Chemokinrezeptor CCR7. CCR7 ist ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten-Rezeptorfamilie. Dieser Rezeptor kontrolliert die Migration von T-Gedächtniszellen zum entzündeten Gewebe und stimuliert Dendritische Zellen zur Reifung. Aber auch Dendritische Zellen exprimieren diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche nach erfolgter Reifung, um in den Lymphknoten zu gelangen. Hier soll der Einfluss von Sanglifehrin A auf die Expression des Rezeptors CCR7 überprüft werden. Dafür wurde die Oberflächenexpression von CCR7 bei aktivierten Dendritischen Zellen nach Sanglifehrin A- und Trägersubstanz-Behandlung miteinander verglichen (Abbildung 5.10).

A



B

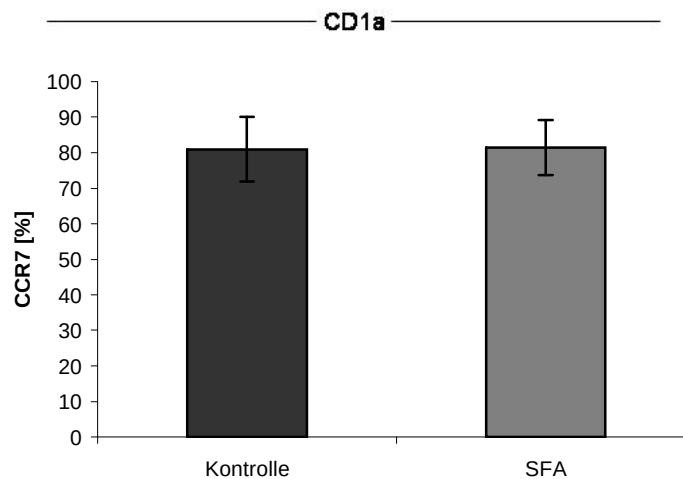


Abbildung 5.10 SFA hat keinen Einfluss auf die CCR7-Expression von DCs. Exemplarisch wird in **A** Dotplotdarstellung der Trägersubstanz-behandelten humanen DCs und 1 µM Sanglifehrin A behandelten Zellen nach 24-stündiger LPS-Stimulation gezeigt. **B** zeigt die CCR7-Expression nach SFA-Behandlung bezogen auf die Kontrolle mit 100%. Die Ergebnisse basieren auf 3 unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM).

5.2.7 Sangliferin A inhibiert die Expression von CD38

CD38 ist ein Ektoenzym, das die Synthese und Hydrolyse von c-ADP-Ribose katalysiert. Außerdem wird durch das Enzym Ca^{2+} mobilisiert, welches für die Signaltransduktion und Migration Dendritischer Zellen wichtig ist (Partida-Sánchez, 2004). Das Enzym CD38 wurde durch eine Behandlung mit Sangliferin A auf Genebene runterreguliert. Dieses Ergebnis sollte auf Proteinebene bestätigt werden. Dafür wurden humane DCs mit oder ohne Sangliferin A behandelt und mit LPS stimuliert. Das Ektoenzym wurde mit Hilfe des CD38-Antikörpers im Durchflusszytometer analysiert. Exemplarisch wird in Abbildung 5.12 gezeigt, dass eine Hemmung der CD38-Expression durch SFA erfolgte. Die Expression auf Proteinebene des CD38 wurde aus 5 unabhängigen Experimenten evaluiert (Abbildung 5.11) bei einer LPS-Gabe von 1 ng/mL und 6 Experimente für 100 ng/mL LPS.

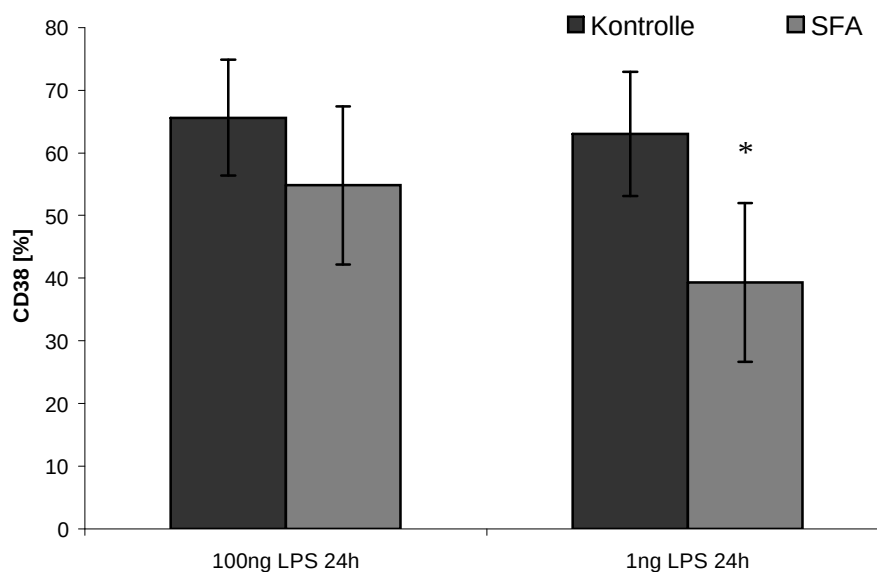


Abbildung 5.11 SFA inhibiert die CD38-Expression von humanen Dendritischen Zellen nach LPS-Stimulation mit einer Dosis von 100 ng/mL (n=6) oder 1 ng/mL (n=5). Die statistische Auswertung erfolgte mit Wilcoxon * $P < 0.05$ vs. Kontrolle.

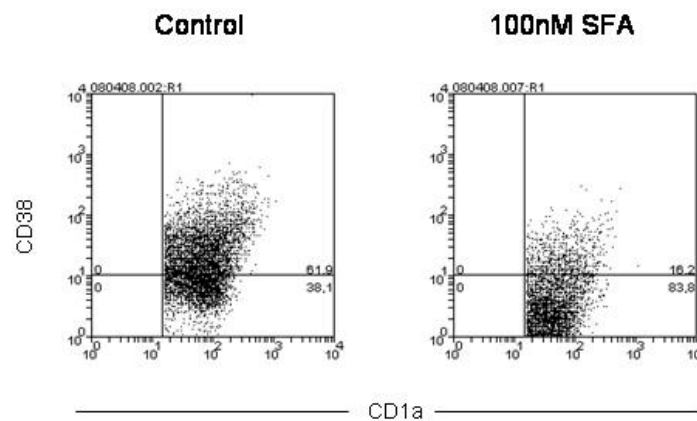


Abbildung 5.12 Exemplarische Dotplot-Darstellung der CD38-Expression bei Sanglifehrin A (SFA)- oder Trägersubstanz-behandelten humanen Dendritischen Zellen nach LPS-Stimulation mit einer Dosis von 1 ng/mL für 24h.

Die Dosisabhängigkeit der CD38-Proteinexpression nach SFA-Behandlung wurde überprüft. Hierfür wurden CD1a-positive Dendritische Zellen mit der Trägersubstanz (Ethanol) behandelt und mit LPS aktiviert. Dies führte zu einer Hochregulation der CD38 Oberflächenexpression auf 73 %. Die Zellen, die mit Sanglifehrin A behandelt wurden und mit LPS stimuliert wurden, zeigten eine dosisabhängige Runterregulierung des CD38-Proteins. Bei einer Dosis von 500 nM sind nur noch 42 % der Zellen CD38 positiv. CsA dagegen, ein strukturverwandtes Immunsuppressivum von SFA, zeigte keine dosisabhängige Regulation der CD38-Expression (Abbildung 5.13).

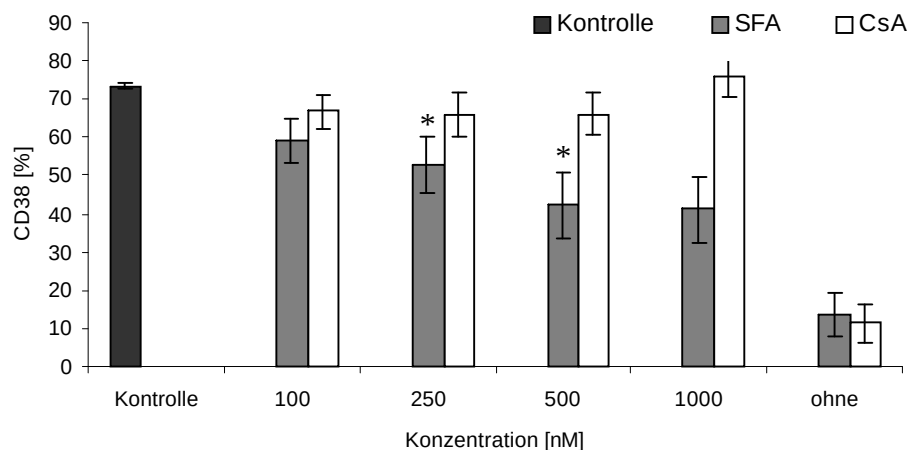


Abbildung 5.13 Dosisabhängige Runterregulierung der CD38-Expression nach Sanglifehrin A (SFA)-Behandlung im Vergleich mit Cyclosporin A (CsA). Dosiskurve der CD38-Expression nach SFA, CsA und Trägersubstanz-Behandlung humaner Dendritischer Zellen nach einer LPS-Stimulation von 12 h und einer Dosis von 1 ng/ml. "ohne" bezeichnen Zellen, die nicht mit LPS stimuliert wurden. Es wurden v.l.n.r 28, 8, 5, 8, 6, 8, 7, 2, 2, 3 und 2 unabhängige Experimente durchgeführt. Statistik nach Wilcoxon * $P < .05$ vs. Kontrolle.

Die CD38-Expression bei DCs wurde durch SFA & Rapamycin nach einer 100 ng/mL LPS-Behandlung auf Proteinebene schwach runterreguliert. Wohingegen CsA keine Hemmung der CD38-Expression zeigte (Abbildung 5.14).

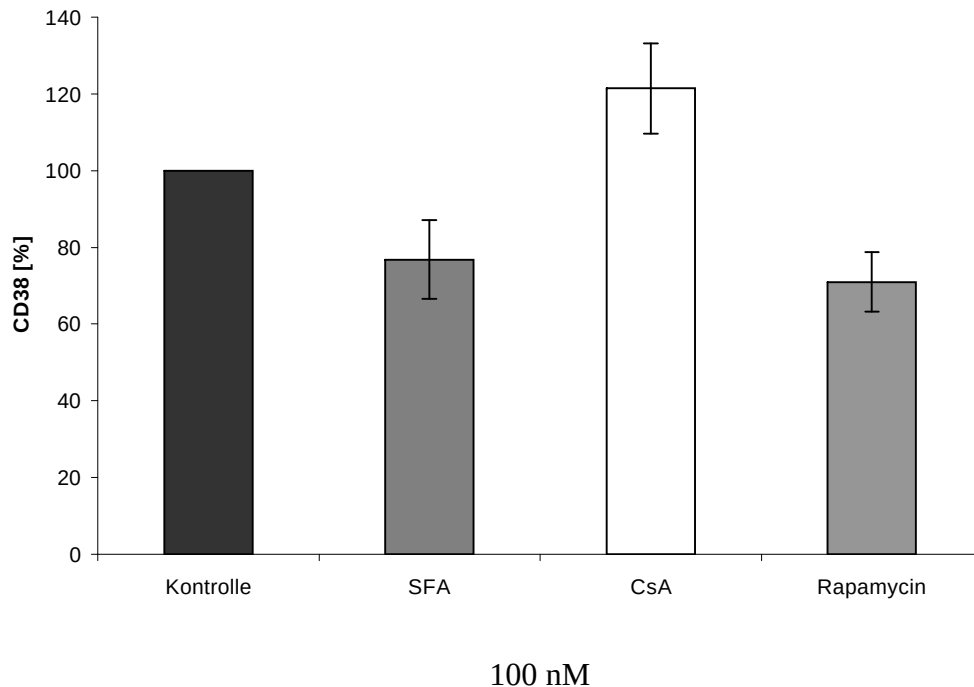


Abbildung 5.14 Relative CD38-Expression in % nach Stimulation mit 100 ng/mL LPS Dendritischer Zellen und Behandlung mit verschiedenen Immunsuppressiva (jew. 100 nM) bezogen auf die CD38-Expression stimulierter, Trägersubstanz-behandelter Zellen mit 100 %. Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, $n=6$.

Die Expression von CD38 wurde auch bei T-Zellen überprüft. Die T-Zellen wurden in $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen unterschieden und mit Sanglifehrin A und anderen Immunsuppressiva behandelt. Die veränderte CD38-Expression wird in der Abbildung 5.15 gezeigt. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 aktiviert und danach im Durchflusszytometer analysiert. Es konnte keine Änderung der CD38-Expression nach einer Behandlung mit 100 nM Sanglifehrin A bei $CD8^+$ -T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 5.15). Während eine Hemmung der $CD4^+$ -T-Zellen dosisabhängig aber nicht signifikant erfolgte (Abbildung 5.16).

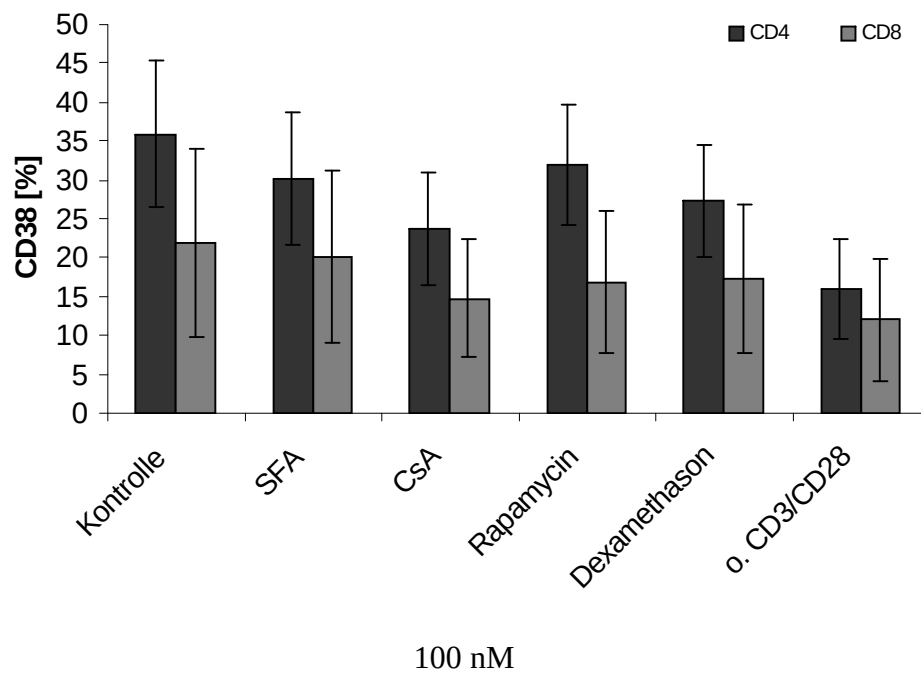


Abbildung 5.15 Keine Änderung der CD38-Expression bei T-Lymphozyten nach Behandlung mit Sanglifehrin A, Cyclosporin A, Rapamycin, Dexamethason (jew. 100 nM) im Vergleich zur Kontrolle. Es wurden jeweils 4 unabhängige Experimente durchgeführt (Mittelwert $\pm$ SEM).

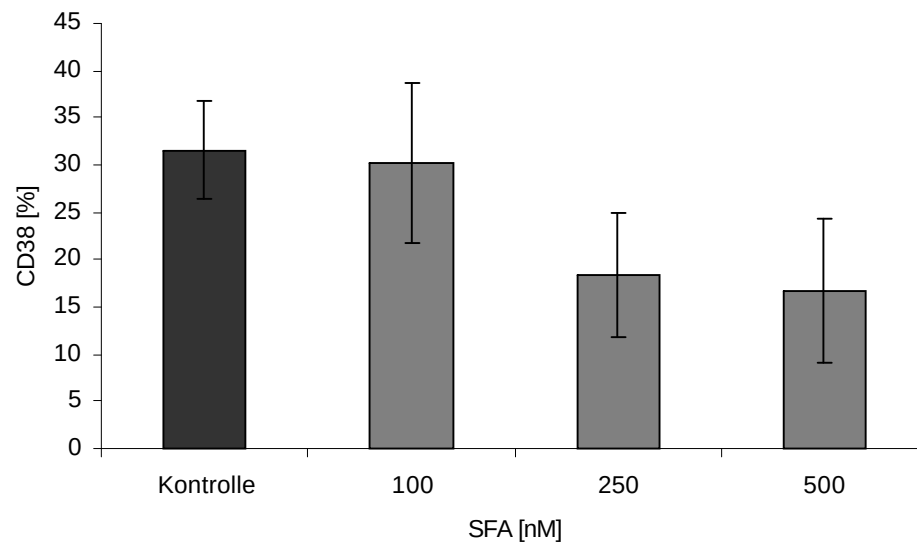


Abbildung 5.16 CD38-Expression von Sanglifehrin A-behandelten aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit SFA oder Trägersubstanz 4h behandelt und mit anti-CD3/anti-CD28 für 24h Stunden stimuliert. Es wurden 10 unabhängige Kontrollen, für 100 nM SFA wurden 4 und für 250 nM und 500 nM SFA wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt (Mittelwert $\pm$ SEM).

5.2.8 *In vitro*-Untersuchung zur Beeinflussung der Migration von DCs

Bei einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass unbehandelte, aktivierte humane DCs zu dem Überstand aus SFA-behandelten Dendritischen Zellen in einem geringeren Maß wandern als zum Überstand Trägersubstanz-behandelter Zellen. Als weitere Kontrolle wurde der Überstand Trägersubstanz-behandelter humaner DCs verwendet und diesem, nach dem Entfernen der Zellen, Sanglifehrin A hinzugefügt. Diese *carry over*-Kontrolle diente dazu den direkten Effekt von Sanglifehrin A auf die Zellen auszuschließen. Die Chemokinese, also die ungerichtete Wanderung der Zellen, wurde zudem untersucht und die Daten dementsprechend korrigiert (Abbildung 5.17).

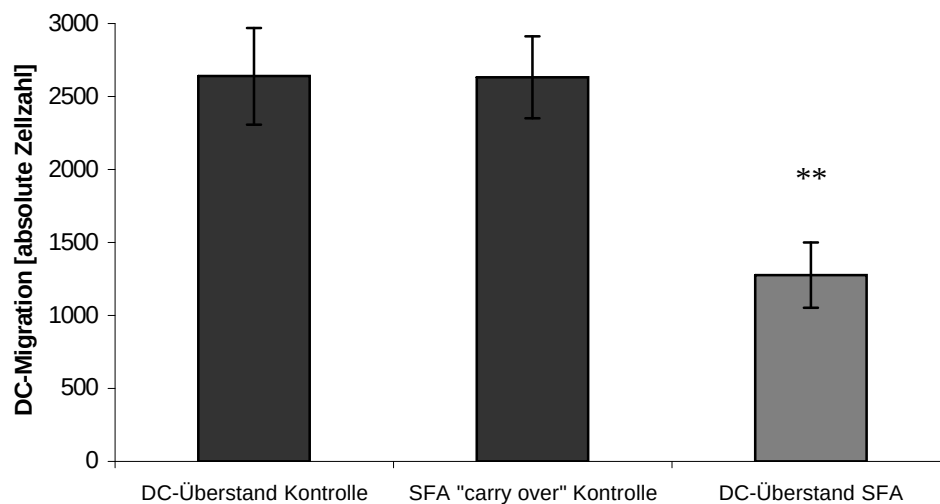


Abbildung 5.17 Inhibierte *in vitro*-Migration von reifen Dendritischen Zellen, die zum DC-Überstand SFA-behandelter Zellen wanderten. Zur Kontrolle diente die Migration reifer DCs zum DC-Überstand Trägersubstanz-behandelter DCs sowie die Kontrolle Trägersubstanz-behandelten DC-Überstand versetzt mit Sanglifehrin A (SFA *carry over* Kontrolle). 1673 Zellen zeigten eine spontane Wanderung (Chemokinese), deshalb wurden die gezeigten Daten um diesen Wert korrigiert. Die Ergebnisse repräsentieren neun Kontroll-Experimente und 10 SFA-Experimente (Mittelwert $\pm$ SEM). Statistik: Wilcoxon $**P < 0.01$ vs. Kontrolle

5.2.9 *In vitro*-Untersuchung zur Beeinflussung der Migration von T-Lymphozyten

Mit anti-CD3/anti-CD28 aktivierte $CD4^+$ -T-Zellen wurden in die obere Kammer der Transwells gegeben, während in die unteren Kammern Medium oder Trägersubstanz- bzw. Sanglifehrin A-behandelte Zellüberstände vorgelegt wurden. Über einen Zeitraum von 4 Stunden wurde den T-Zellen erlaubt, sich zu den Überständen zu bewegen. Um die Chemokinese (ungerichtete Migration) zu detektieren, wurden aktivierte T-Zellen eingesetzt, die zum Medium wanderten. Die T-Zellmigration wurde durch Sanglifehrin A inhibiert (Abbildung 5.18).

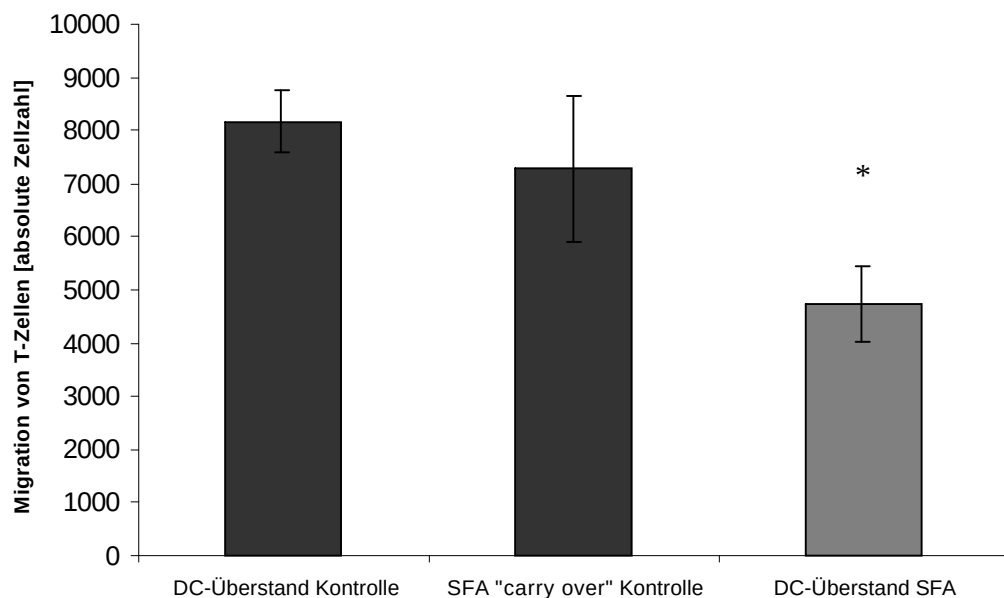


Abbildung 5.18 Inhibition der *in vitro*-Migration von aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen, die zum DC-Überstand SFA-behandelter Zellen wandern im Vergleich zum DC-Überstand Trägersubstanz-behandelter Zellen. Außerdem die Kontrolle auf carry over. Die gezeigten Daten wurden um die spontane Migration von 8676 T-Zellen korrigiert. Es wurden 5 separate Experimente durchgeführt (Mittelwert $\pm$ SEM). Die Statistik wurde mit Wilcoxon durchgeführt (* $P < .05$).

Außerdem wurde die Migrationsbereitschaft der aktivierten T-Zellen zu den Chemokinen CCL19, CCL17 und CCL5 überprüft (Abbildung 5.19). Die Wanderung der T-Zellen zu den Chemokinen CCL17 und CCL5 wurde durch Sanglifehrin A schwach beeinflusst. Eine durch SFA verursachte verminderte T-Zellmigration konnte bei einer Migration zum Chemoattraktant CCL19 gezeigt werden.

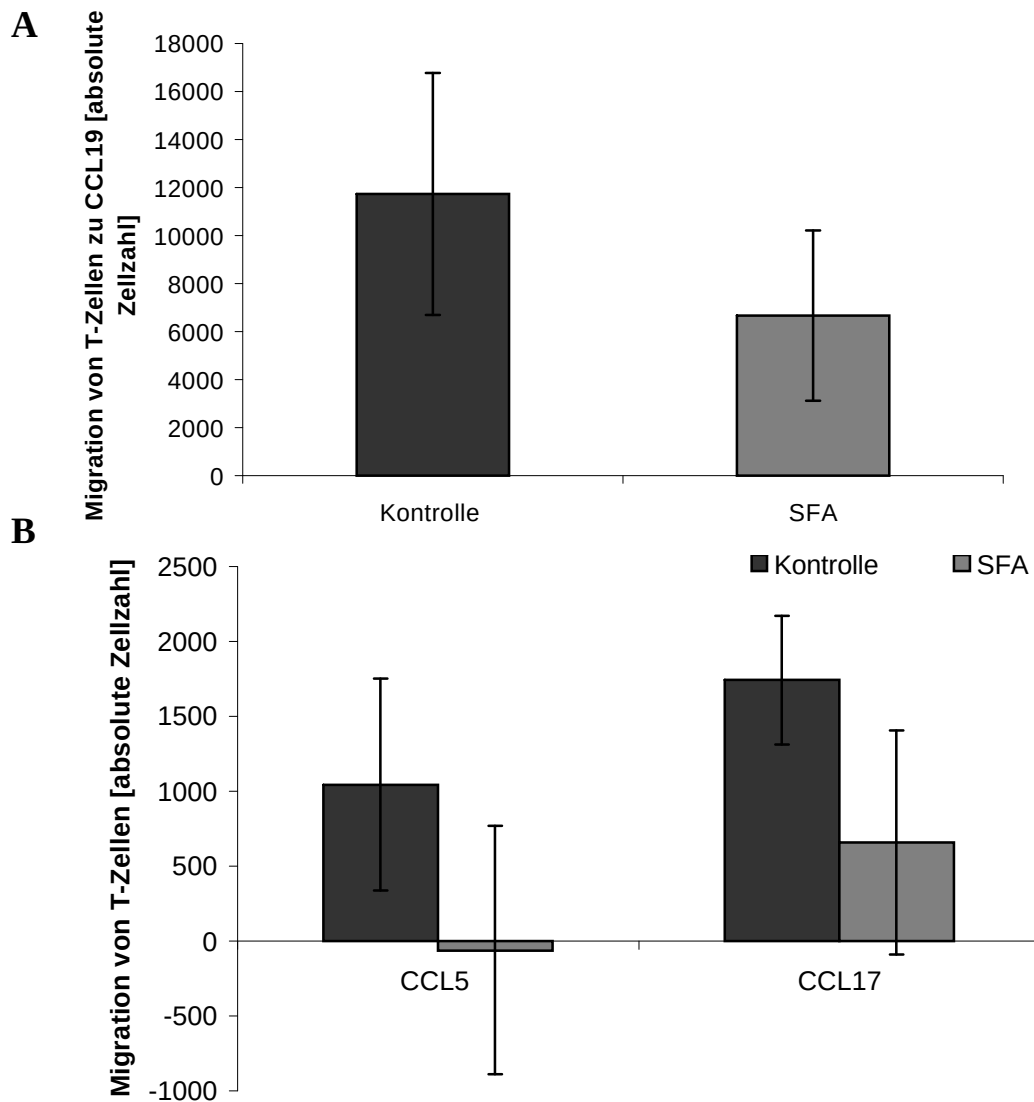


Abbildung 5.19 Verminderte Migration von aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen zu den Chemokinen CCL5, CCL17(**B**) und CCL19(**A**) nach Sanglifehrin A-Behandlung im Vergleich zu Trägersubstanz-behandelten T-Zellen. Die dargestellten migrierten Zellzahlen wurden um die Chemokinese mit 8879 Zellen korrigiert dargestellt ($n=6$ unabhängige Experimente, Mittelwerte $\pm$ SEM).

5.3 SFA inhibiert die *in vivo* Migration von Dendritischen Zellen

Für die *in vivo*-Migration wurde die „FITC-Painting“-Methode angewendet. FITC (*Fluorescein-5-isothiocyanate*) ist ein weit genutztes Fluorophor. FITC besitzt eine gelb-orange Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 495 nm und einen Emissionsmaximum bei 525 nm. Es geht Bindungen mit Proteinen oder Peptiden ein, diese Bindung erfolgt an den freien Aminogruppen der Proteine oder Peptide.

Die C57BL/6NCrl-Mäuse wurden an zwei Tagen mit einer täglichen intraperitonealen Injektion der Trägersubstanz injiziert. Am zweiten Tag wurde FITC auf das gescherte Abdomen der zuvor behandelten Mäuse aufgetragen und für unterschiedliche Zeiträume (0, 4, 8, 16, 24 oder 48 Stunden) auf den lebenden Mäusen belassen. FITC-markierte Dendritische Zellen wanderten in den Lymphknoten mit der höchsten Einwanderungsrate nach 24 h. Die Zeitkurve Abbildung 5.20 A verdeutlicht diese Wanderung. Nach der Ermittlung des optimalen Zeitpunktes für die FITC-Gabe (Abbildung 5.20 A) wurde den Tieren 10 mg/kg KG Sanglifehrin A an zwei Tagen injiziert und FITC wurde auf das gescherte Abdomen aufgetragen. Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet und der Inguinal-Lymphknoten wurde den Tieren entnommen. Die Zellen wurden aus dem Organ gewonnen und mit einem CD11c⁺-Antikörper für die Detektion von DCs markiert. Die Zellen, die vom Abdomen in die drainierenden Lymphknoten gewandert waren, wurden durch das FITC markiert. Die Untersuchung der *in vivo*-Migration zeigt, dass auch im Maussystem eine verminderte Migration Sanglifehrin A-behandelter Zellen im Vergleich zu Zellen aus Trägersubstanz-behandelten Mäusen zu beobachten ist (Abbildung 5.20 B & C).

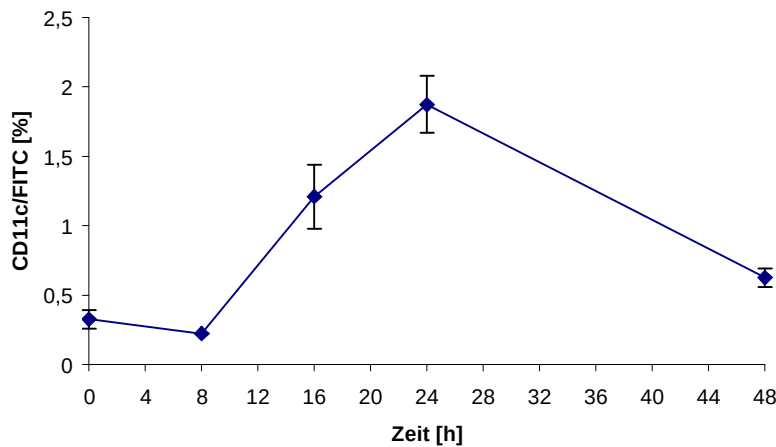
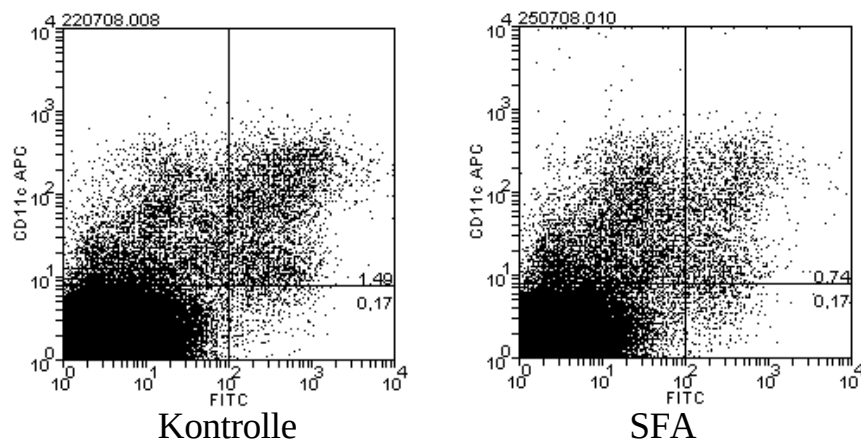
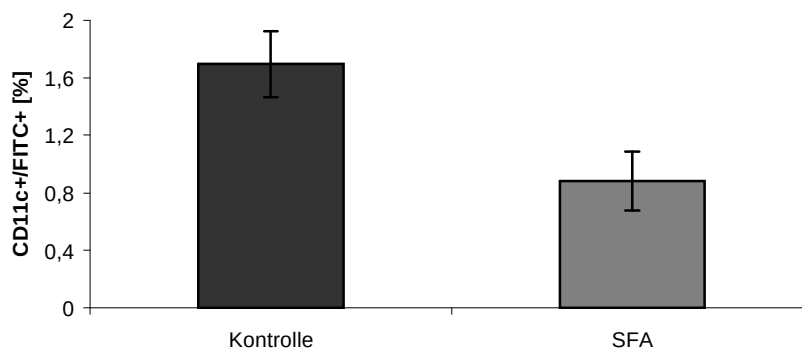
A**B****C**

Abbildung 5.20 Inhibierte *in vivo* Migration Dendritischer Zellen von SFA-behandelten Mäusen in den Inguinal-Lymphknoten nach FITC-Behandlung. Im Vergleich sind Trägersubstanz- und Sangliferrin A-behandelte Tiere zu beobachten. Die Zeitkurve (A) zeigt die Anzahl der FITC/CD11c-positiven Zellen, die zum Inguinal-Lymphknoten migriert sind. B zeigt exemplarisch eine Dotplot-Ansicht von FITC und CD11c-positiven Zellen des Inguinal-Lymphknotens von Trägersubstanz- und SFA-behandelten Tieren. C zeigt die Inhibition von SFA auf die Migration Dendritischer Zellen nach einer 24-stündigen Migration. Es wurden hierbei 5 Tiere/Gruppe verwendet (prozentuale Mittelwerte $\pm$ SEM).

6 Diskussion

Der Immunophilin-Ligand CsA wird in der Klinik als immunsuppressives Medikament genutzt, aber die Nebenwirkungen, wie Nieren- und Neurotoxizität, verringern seine Einsetzbarkeit. Das neue Mitglied der Immunophilin-bindenden Liganden-Familie SFA hat die Fähigkeit ein nützliches Immunsuppressivum mit klinischer Anwendung zu werden (Zenke, Strittmatter et al. 2001; Zhang and Liu 2001; Hackstein, Steinschulte et al. 2007; Ko, Hambly et al. 2008).

6.1 Genexpressionsänderung nach Sanglifehrin A-Behandlung bei humanen Dendritischen Zellen

Die Wirkungsweise von Sanglifehrin A ist bislang nur unzureichend untersucht worden. Eine globale Genexpressionsstudie bot die Möglichkeit regulierte Gene nach Sanglifehrin A-Behandlung systematisch festzustellen. Es wurde hierfür die Expression der Gene in humanen DCs, welche mit LPS aktiviert und mit SFA behandelt wurden, mit der Genexpression aktivierter, mit Trägersubstanz-behandelten DCs verglichen. Somit konnte gezeigt werden, welche Gene durch SFA nach oben bzw. nach unten reguliert wurden. Nach Korrektur des Hintergrundrauschens und Holm-Korrektur ergab die Selektion der Gene nach dem p-Wert, dass 260 Gene durch SFA signifikant reguliert wurden (Abbildung 5.1).

Anhand der Durchführung einer „Pathway“-Analyse mit dem Programm „PathwayExpress“ konnte der größte Anteil der 260 Gene immunologisch relevanten Signalwegen zugeordnet werden (Abbildung 5.2). Aktivierte Trägersubstanz-behandelte DCs hatten ein charakteristisches Chemokinexpressionsprofil, das durch SFA-Behandlung deutlich verändert wurde. Von allen signifikant regulierten Genen war CCL19 das am stärksten runterregulierteste Gen. CCL19, CXCL9, CCL5 und CCL17 gehören zu den Top 15, sortiert nach dem Koeffizienten, der signifikanten runterregulierten Gene.

Außerdem wurde eine signifikante Erhöhung der Genexpression von IL-1RII festgestellt. Dieser Rezeptor agiert als „Decoy“-Rezeptor für IL-1 (Colotta, Dower et al. 1994; Mantovani, Locati et al. 2001). Die Nutzung solcher „Decoy“-Rezeptoren stellen Möglichkeiten dar, die Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine zu regulieren. LPS-Behandlung myelomonozytärer Zellen reduziert die IL-1RII-Expression, wohingegen die Gabe von zum Beispiel Aspirin den IL-1RII-Level erhöht (Daun, Ball et al. 1999; Penton-Rol, Orlando et al. 1999).

6.2 In vitro Proteinexpressionen

6.2.1 IL-1RII-Proteinexpression

Die Erhöhung des IL-1sRII und des membraninsetierten IL-1RII auf Proteinebene konnte für die Gabe von SFA nicht bestätigt werden (Abbildung 5.3). Die Gabe von Dexamethason hingegen führte zu einem deutlichen Anstieg der IL-1sRII-Proteinexpression bei humanen DCs. 1997 wurde bereits eine mRNA-Erhöhung des IL-1RII nach Dexamethason-Behandlung *in vivo* bei PBMCs und Neutrophilen festgestellt (Yu, Schuler et al. 1997).

6.2.2 Chemokin-Expressionen

Aufgrund des auffälligen Chemokin-Expressionsmusters Sanglifehrin A-behandelter DCs auf Genebene wurden diese Chemokine auch auf Proteinebene untersucht. Chemokine sind chemotaktische Zytokine und dirigieren u.a. die Migration (Bachmann, Kopf et al. 2006). DCs produzieren eine Vielzahl an Chemokinen, dies konnte bereits Piqueras zeigen (Piqueras, Connolly et al. 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sanglifehrin A in breite Chemokin-Expressionsänderungen auf Gen- und Proteinebene involviert ist. Sanglifehrin A inhibierte die Chemokinproduktion von CCL5, CXCL9, CXCL10, CCL17 und CCL19. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass SFA in einen bzw. mehrere Signalwege eingreift, die zur Transkription von verschiedenen Chemokinen führen. Die Hemmung der Chemokin-Freisetzung durch DCs erfolgte wahrscheinlich aufgrund verminderter CCL5-, CXCL9-, CXCL10-, CCL17- und CCL19-Genexpression.

Während der Reifung und Migration Dendritischer Zellen werden die inflammatorischen Chemokine CCL5, CXCL9 und CXCL10 exprimiert. CXCL9 und

CXCL10 sind die Liganden für CXCR3. Die Bindung an CXCR3 führt zu pleiotropen Effekten, wie die Stimulation von Monozyten, Natürliche Killerzellen (NKs), T-Zellmigration und der Modulation der Expression von Adhäsionsmolekülen (Sallusto, Lenig et al. 1998; Zlotnik and Yoshie 2000; D'Ambrosio, Panina-Bordignon et al. 2003). Mit Hilfe von ELISAs konnten die Chemokine CXCL9 und CXCL10 in den Zellüberständen gemessen werden. Dabei konnte die Hemmung der CXCL9- und CXCL10-Expression auf mRNA-Ebene durch SFA in DCs auf Proteinebene verifiziert werden. Mit 46 % und 56 % zeigte sich eine ausgeprägte Hemmung der CXCL9- und CXCL10-Proteinexpression durch SFA (Abbildung 5.4). Die Durchführung der Stimulation mit Ethanol als Lösemittel (max. Konzentration von Ethanol: 0,0098%) aller eingesetzten Immunsuppressiva bestätigt, dass ausschließlich die immunsuppressiven Substanzen die beobachteten Wirkungen bedingen und Ethanol keinen Einfluss auf die Protein-Produktionen hat. Die Tatsache, dass eine verminderte CXCL9-Expression auf mRNA-Ebene durch SFA auch zu einer Verringerung der Chemokin-Freisetzung führte und eine Hemmung von CXCL9 akute Lungen-Transplantatabstoßungsreaktionen reduziert (Belperio 2003), könnte SFA als ein geeignetes Immunsuppressivum mit klinischer Anwendung bestätigen. Da CXCL9 als Chemoattraktor u. a. für T-Zellen wirkt (Hancock 2000), wäre es sinnvoll, in weiteren Untersuchungen den eventuellen Einfluss von SFA auf die Rezeptorexpression auf T-Zellen zu überprüfen, um die Chemokin-Chemokin-Rezeptor-Interaktion besser studieren zu können.

Die Expression von CXCL9 und CXCL10 kann durch den aktivierten Transkriptionsfaktor STAT1 erfolgen (Mikhak, Fleming et al. 2006). Die Hemmung der STAT1-Expression konnte durch SFA im Microarray gezeigt werden, deshalb könnte die nachfolgende gehemmte Proteinexpression von CXCL9 und CXCL10 daher stammen, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Aktivierung und Neusynthese von STAT1 nicht unmittelbar zusammenhängen.

CCL5 (RANTES) wird in Dendritischen Zellen nach inflammatorischen Stimulus exprimiert und fördert eine T_{H1}-Antwort (Schluger and Rom 1997; Sallusto, Palermo et al. 1999). Auch CCL5 wird in dieser Studie durch Sanglifehrin A zirka 70 % gehemmt im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.4). CCL5 ist ein vielseitiges Chemokin, das nicht nur in die Chemotaxis sondern auch als Leukozytenaktivator und bei

inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Funktion einnimmt. CCL5 wurde bekannt, da es die HIV-Replikation unterdrückt (Cocchi, DeVico et al. 1995). CCL5 ist der natürliche Ligand des Oberflächen-Rezeptors CCR5. CCR5 stellt für HIV einen Korezeptor neben dem CD4-Rezeptor dar. Es konnte nach Blocken dieses Rezeptors eine CCR5-abhängige Inhibition der HIV-Infektion nachgewiesen werden (Cocchi, DeVico et al. 1995; Kinter, Catanzaro et al. 1998; Appay and Rowland-Jones 2001). Unter einigen Bedingungen kann CCL5 die HIV-Replikation erhöhen (Appay and Rowland-Jones 2001). Diese Eigenschaften hängen von der Bindung an Glukosaminoglykane und von der Möglichkeit Aggregate zu bilden ab (Appay and Rowland-Jones 2001). Eine erhöhte CCL5-Expression wird für verschiedene inflammatorische Beschwerden und Pathologien, so zum Beispiel für allogene Transplantatabstoßung und bestimmten bösartigen Tumoren verantwortlich gemacht (Choi, Hildebrandt et al. 2007; Kapoor 2008). Die Hemmung der CCL5-Expression durch SFA stellt eine Möglichkeit dar, in diesen z.B. immunologischen Erkrankungen regulierend einzugreifen.

Das konstitutive Chemokin CCL17 bindet an den Rezeptor CCR4 (Imai, Baba et al. 1997). CCL17 wird hauptsächlich von DCs gebildet (Lieberam and Förster 1999; Alferink, Lieberam et al. 2003). Die Ergebnisse der ELISAs zeigen, dass CCL17 in hohen Mengen nach LPS-Stimulation von DCs gebildet wird. Es sieht danach aus, dass inflammatorische DCs befähigt sind naive T-Zellen (CCL19) als auch Gedächtnis-T-Zellen (CCL17) anzulocken, welche auch den Chemokinrezeptor CCR4 tragen. Zusätzlich tragen NK-Zellen auf ihrer Oberfläche CCR4, so dass sie von CCL17 angelockt werden können. Dadurch stellen DCs eine Verbindung zwischen der adaptiven und der angeborenen Immunantwort dar (Maghazachi 2003).

Eine neue Studie aus 2008 von Henry zeigt, dass die CCL1- und CCL17-Expressionen von der IL-12-Expression abhängen. So führt die Abwesenheit von IL-12 zu einer verminderten Expression an CCL1 und CCL17 nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* in Dendritischen Zellen (Henry, Ornelles et al. 2008). In 2003 konnte Steinschulte zeigen, dass Sanglifehrin A die IL-12-Expression reifer DCs nach LPS-Stimulation Cyclophilin-A-unabhängig hemmt (Steinschulte, Taner et al. 2003). In dieser Studie konnte Sanglifehrin A die CCL17-Expression in DCs, nach erfolgter Reifung mit LPS, um 63 % supprimieren. Somit passen die gesammelten Erkenntnisse

über die Wirkung von Sanglifehrin A hinsichtlich der IL12- und CCL17-Produktion zu den von Henry gemachten Beobachtungen. Dagegen scheint die CCL1-Produktion durch Sanglifehrin A unbeeinflusst zu sein, obwohl Henry auch einen Einfluss der CCL1-Expression durch IL-12-Produktion erkennt. Es liegt nahe, zu vermuten, dass Sanglifehrin A die CCL1-Expression IL-12-unabhängig reguliert beziehungsweise diese Korrelation nicht ausschlaggebend für die CCL1-Produktion ist.

Humane LPS-induzierte DCs aktivieren die RAF-1 Kinase, die wiederum über eine Aktivierung von RIP2, die IL-12p40-Genexpression herbeiführen können (Usluoglu, Pavlovic et al. 2007). Sanglifehrin A inhibiert die Phosphorylierung der RAF-1 Kinase (Sanchez-Tillo, Wojciechowska et al. 2006), aber die Art der Interaktion von Sanglifehrin A mit der RAF-1 Kinase ist noch nicht geklärt. Es kann nur die Vermutung geäußert werden, dass SFA über die Inhibition der RAF-1 Kinase auf die IL-12-Expression und CCL17-Produktion wirkt. Die RAF-1 Kinase, die durch SFA inhibiert wird, gehört dem MEK-ERK-Signalweg an. ERK kann nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren aktivieren und ist für die Expression von unter anderem CCL17 wichtig (Lee, Shim et al. 2007).

Eine weitere Möglichkeit eine CCL17-Expression auszulösen, stellt der JAK-STAT-Signalweg dar. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor STAT6 für die Expression von CCL17 notwendig ist (Fulkerson, Zimmermann et al. 2004). STAT6 wurde durch SFA auf Genebene herunterreguliert, dies zeigte das Microarray-Ergebnis. Das könnte zur Folge haben, dass die Proteinexpression von CCL17 unter SFA-Einfluss stark gehemmt wurde.

Die Transkription von CCL1 ist abhängig von der Aktivierung von ERK1/2 und ihren nachgeschalteten Zielmolekülen, dem AP-1-Komplex. Außerdem konnte die Induktion von CCL1 über eine STAT5-abhängige Expression des Moleküls: *cytokine inducible SH2-domain containing protein* (CIS) negativ reguliert werden (Hintzen, Haan et al. 2008). Für eine Regulation von c-Jun und c-Fos (AP-1-Komplex), STAT5 und CIS nach SFA-Behandlung liegen nach den Microarray-Ergebnissen keine Hinweise vor.

Wenn die DCs den Lymphknoten erreichen, produzieren sie CCL19, CCL22 und CXCL13, diese ziehen naïve T-, B-Zellen und DCs an (Ngo, Tang et al. 1998; Piqueras, Connolly et al. 2006). Die 84 %-ige CCL19-Hemmung nach Sanglifehrin A-Behandlung fiel im Vergleich zu allen anderen analysierten Chemokinen am stärksten aus, was die Ergebnisse der Genexpression unterstützt (Abbildung 5.4). Außerdem konnte nach SFA-Behandlung und einer Stimulation mit LPS oder mit Poly I:C/IFN γ eine Runterregulation von CCL19 gezeigt werden (Abbildung 5.5). LPS interagiert mit dem *Toll like receptor 4* (TLR4), während Poly I:C mit dem TLR3 interagiert und somit die Reifung der DC auslöst. Es konnte auch gezeigt werden, dass LPS ein potenterer Aktivator der CCL19-Expression darstellt als Poly I:C. CCL19 greift wie alle anderen Chemokine auch in verschiedene inflammatorische Erkrankungen ein.

Die auf Proteinebene festgestellte breite Chemokinhemmung durch Sanglifehrin A stellt so eine interessante und potenzielle Möglichkeit dar, in immunologische Erkrankungen regulierend einzugreifen.

Die Dosisabhängigkeit der CCL5-, CCL17- und CCL19-Hemmung konnte nach Behandlung mit SFA festgestellt werden, wobei die mitgeführten Cyclosporin A-behandelten Gruppen keine dosisabhängige Suppression der Chemokine zeigte (Abbildung 5.6).

6.2.3 Chemokinexpression von DCs nach SFA-, CsA-, Rapamycin- und Dexamethason-Behandlung

Die 92 %-ige Hemmung der CCL5-Expression durch Sanglifehrin A konnte durch die Gabe von Rapamycin mit durchschnittlich 84 % Hemmung ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 5.7). Dies ließ sich für die CCL19-Expression auch zeigen, dabei wurde die Hemmung von CCL19 bei SFA-behandelten Zellen um 87 % und bei Rapamycin-behandelten Zellen um 91 % gehemmt. Dagegen waren die Cyclosporin A- und Dexamethason-behandelten Zellen in keiner Hemmung der CCL5 und einer durchschnittlich 50 %-igen Hemmung von CCL19 involviert. Die Hemmung der CCL5- und CCL19-Proteinexpression durch SFA wurde sehr wahrscheinlich auf Genebene herbeigeführt, dies wurde für Rapamycin noch nicht überprüft.

Da die Hemmung der CCL17-Produktion durch die Behandlung der Zellen mit SFA deutlich stärker war als die Behandlung mit den anderen Immunophilin-bindenden Immunsuppressiva und Dexamethason, konnte sich SFA als der potenteste CCL17-Inhibitor präsentieren (Abbildung 5.7). Eine Studie von Furukawa zeigte eine Hemmung der CCL17-Expression nach Behandlung von PBMCs mit CsA und Dexamethason. Diese Beobachtung konnte in dieser Studie bei DCs bestätigt werden (Furukawa, Nakamura et al. 2004).

CXCL9 und CXCL10 wurden durch SFA deutlich gehemmt (Abbildung 5.4). Die anderen Immunsuppressiva zeigten nur geringe, nicht signifikante Hemmungen (Abbildung 5.7) bei beiden untersuchten Chemokinen. In 2003 konnte Belperio an einem Rattentransplantationsmodell zeigen, dass die Gabe von anti-CXCL9 und niedrig dosierten Cyclosporin A zu einem verlängerten Transplantatüberlebens der Lunge führte (Belperio, Keane et al. 2003). Die Gabe von SFA und niedrig dosierten CsA könnte wahrscheinlich auch zu einem verlängerten Transplantatüberlebens der Lunge führen, da CXCL9 eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von mononukleären Zellen spielt und durch SFA signifikant inhibiert wird.

Nur SFA zeigte bei allen untersuchten Chemokinen eine deutliche Hemmung im Gegensatz zu den anderen Immunsuppressiva, dies deutet auf eine einzigartige breite Chemokinhemmung nach SFA-Behandlung hin.

Die kompetitiven Experimente resultierten in einer verstärkten Abnahme der Chemokinexpression durch Vorinkubation der DCs mit CsA. Die Hemmung der CCL5-, CCL17- und CCL19-Chemokinexpressionen nach gemeinsamer CsA- und SFA-Gabe konnte im Vergleich zur Gabe von SFA allein erhöht werden (Abbildung 5.8). Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Wirkweise von Sanglifehrin A hin.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass CsA Cyclophilin-A absättigt, so dass freies SFA vermehrt für die Bindung eines anderen Effektormoleküls zur Verfügung steht. Dieses unbekannte Effektormolekül könnte in Chemokin-Expressionswege involviert sein. Diese Hypothese steht für einen Cyclophilin-A-unabhängigen Signalweg. Es ist bereits bekannt, dass SFA die Phosphorylierung der RAF-1 Kinase inhibiert und so diese Kinase inaktiviert (Sanchez-Tillo, Wojciechowska et al. 2006). Die RAF-1 Kinase gehört zum MEK-ERK-Signalweg. Die ERK-Kinase greift unter anderem in die Proliferation und Migration hämatopoetischer Zellen ein. Überdies ist der MEK-ERK-

Signalweg an der Chemokinexpression von zum Beispiel CCL17, CXCL9 und CXCL10 beteiligt (Kanda, Shimizu et al. 2007; Lee, Shim et al. 2007). In einer Studie von Comalada konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK Calcineurin-unabhängig und Immunophilin-abhängig erfolgt (Comalada, Valledor et al. 2003). An die RAF-1 Kinase kann ein Immunophilin (FKBP65) binden (Coss, Stephens et al. 1998). Da keine direkte Interaktionsstudie zwischen SFA und der RAF-1 Kinase existiert, wäre es denkbar, dass diese Bindung Immunophilin-vermittelt stattfindet.

6.3 Migration Dendritischer Zellen nach SFA-Behandlung

Dendritische Zellen wandern entlang eines CCL19-Gradienten zum Lymphknoten, daher exprimieren diese Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 auf ihrer Oberfläche. In einem Migrationsassay konnte man beobachten, dass SFA-behandelte Zellen eine verminderte Migration zu CCL19 zeigten, im Vergleich zu Trägersubstanz-behandelten DCs (Abbildung 5.9). Aufgrund dieser Beobachtung wurde der CCR7-Rezeptor auf der Oberfläche Dendritischer Zellen untersucht. Es konnte keine Beeinflussung der CCR7-Expression festgestellt werden, so dass die verminderte Migration SFA-behandelter Zellen im Vergleich zur Kontrolle CCR7-unabhängig erfolgte (Abbildung 5.10).

CCL17 wurde in einem anderen Migrationsassay als Chemoattraktant vorgelegt, auch hier konnte eine verminderte Migration SFA-behandelter DCs im Vergleich zu Trägersubstanz-behandelten DCs festgestellt werden (Abbildung 5.9). CCL17 bindet an den Chemokinrezeptor CCR4, welcher auch von maturierten DCs exprimiert wird (Sallusto and Lanzavecchia 1999; Freeman, Stolberg et al. 2006). Hierbei soll noch geklärt werden, ob eine veränderte CCR4-Expression der mit SFA-behandelten DCs vorlag oder eine andere Bedingung für eine verminderte Migration ausschlaggebend war.

6.4 SFA inhibiert die CD38-Expression bei Dendritischen Zellen

Das Ektoenzym CD38 produziert cADP-Ribose (cADPR), einen wichtigen Ca^{2+} -mobilisierenden Metaboliten. cADPR bewirkt den Ca^{2+} -Influx in die Zelle. CD38 spielt eine entscheidende und nicht-redundante Rolle bei der Zellmigration. DCs exprimieren CD38, dieses Molekül ist sehr wichtig für die Migration zum Chemoattraktanten CCL19 (Shi, Partida-Sanchez et al. 2007; Randolph, Ochoa et al. 2008). Das Chemokin CCL19 bindet an CCR7 und wird von DCs produziert (Ngo, Tang et al. 1998). Sanglifehrin A-behandelte DCs unterdrückten die CD38-Expression im Vergleich zu Trägersubstanz-behandelten Zellen (Abbildung 5.12), dies führte *in vitro* zu einer verminderten Migration zu CCL19, da die CCR7-Expression durch SFA nicht reguliert wurde. Die unbeeinflusste CCR7-Expression aktivierter DCs kann nicht für die verringerte Migration der DCs verantwortlich sein. CsA zeigte keinen Einfluss auf die CD38-Expression, während Rapamycin eine ähnliche CD38-Supprimierung von 29 % zeigte wie SFA mit 23 % (Abbildung 5.14).

Sordi et al. konnte zeigen, dass Rapamycin eine erhöhte Migration gegenüber der Kontrolle zu CCL19 zeigte, dies ist bedingt durch eine erhöhte CCR7-Expression (Sordi, Bianchi et al. 2006). Dies deutet daraufhin, dass die CD38-Supprimierung von Rapamycin nur eine untergeordnete Rolle für die Migration der DCs gegenüber der CCR7-Expression spielt. Außerdem untersuchte diese Arbeitsgruppe die Migration CsA-behandelter Zellen und konnte weder eine veränderte Migration noch eine veränderte CCR7-Expression im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Die unveränderte Migration CsA-behandelter Zellen trifft sich mit der Beobachtung, dass CsA keinen Einfluss auf die CD38-Expression ausübt.

Interessanterweise ist CD38 humaner DCs bei der IL-12-Induktion involviert (Fedele, Frasca et al. 2004). Steinschulte konnte bereits zeigen, dass SFA die IL-12-Expression inhibiert (Steinschulte, Taner et al. 2003). Die hier gezeigte CD38-Hemmung durch SFA könnte somit im Zusammenhang mit der von Steinschulte beobachteten reduzierten IL-12-Expression stehen.

CD38 wurde mit 73 % auf allen aktivierten DCs produziert. Nicht-aktivierte DCs exprimierten CD38 auf ihrer Oberfläche mit 11 %. T-Zellen zeigten dagegen eine CD38-Expression von nur 30-35 % nach Aktivierung mit anti-CD3/anti-CD28, ohne Aktivierung lag die Expression von CD38 bei 12-16 % (Abbildung 5.15, Abbildung

5.16). Hier zeigte sich keine deutliche Hochregulation von CD38 nach Aktivierung der T-Zellen. Eine verminderte Expression an CD38 konnte bei CD4⁺-T-Zellen nach SFA-Behandlung gezeigt werden, wobei keine Dosisabhängigkeit für CD8⁺-T-Zellen festgestellt werden konnte. Die geringe Oberflächenexpression von CD38 bei humanen T-Zellen geht mit der Beobachtung einher, dass CD38 bei T-Zellen keinen Einfluss auf die Chemokinrezeptor-Signalkaskade besitzt und so die Migration nicht beeinflusst (Shi, Partida-Sanchez et al. 2007).

6.5 *In vitro* Migration Dendritischer Zellen und T-Zellen zum Überstand Sanglifehrin A-behandelter DCs

Unbehandelte aktivierte DCs wanderten zum DC-Überstand SFA-behandelter Dendritischer Zellen vermindert im Vergleich zur Kontrolle. Um einen direkten Einfluss von SFA auf die unbehandelten Dendritischen Zellen auszuschließen, wurde eine zusätzliche Kontrolle (SFA *carry over* Kontrolle) durchgeführt, dabei wurde zum Überstand der Kontrolle SFA hinzugefügt. Die unbehandelten Zellen der Kontrolle verhielten sich während der Migration so wie die *carry over* Kontrolle, so dass ein direktes Einwirken von SFA auf die migrierenden Zellen ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 5.17). Es ist davon auszugehen, dass die verminderte Chemokinproduktion für eine geringere Migration der aktivierten unbehandelten DCs verantwortlich ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass SFA-behandelte Dendritische Zellen eine verminderte Migration zeigen. Dies liegt begründet in der Hemmung von CD38 und in der pleiotropen Chemokin-Suppression.

CD4⁺-T-Zellen zeigten auch eine verminderte Migration zu den Überständen Sanglifehrin A-behandelter Dendritischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.18). So konnte gezeigt werden, dass die T-Zellmigration durch eine verminderte Chemokinproduktion inhibiert wird.

SFA-behandelte CD4⁺-T-Zellen wiesen eine geringere Wanderung zu CCL19 im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 5.19). Shi konnte zeigen, dass CD4⁺-T-Zellen, die aus CD38^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, ganz normal zu CCL19 migrierten (Shi, Partida-Sanchez et al. 2007). Die verminderte CD38-Expression auf SFA-behandelten T-Zellen kann so vermutlich nicht für eine verminderte Migration verantwortlich gemacht werden. Es gilt noch zu klären, wodurch die verminderte Migration ausgelöst

wird. Durch die Überprüfung der Chemokinrezeptoren der T-Zellen nach SFA-Behandlung könnte ein neuer Einblick in die Fähigkeit zur Migration gewonnen werden.

Die Migration von Trägersubstanz-behandelten aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen zu den Chemoattraktanten CCL5 und CCL17 war mit durchschnittlich 1741 und 1045 Zellen gering (Abbildung 5.19). Allerdings konnte bei beiden vorgelegten Chemoattraktanten eine gehemmte Migration durch SFA festgestellt werden. Aktivierte $CD4^+$ -T-Zellen wanderten zu CCL5, dies wurde in einer 2007 erschienen Studie von Damsker beschrieben (Damsker, Bukrinsky et al. 2007). Auch aktivierte $CD4^+$ -T-Zellen tragen den Oberflächenmarker CCR4, an den das Chemokin CCL17 binden kann (Kusumoto, Xu et al. 2007). Die Einflüsse auf die Migration durch SFA bei T-Zellen müssen noch geklärt werden. 1996 haben Bradley und Watson einige wichtige Moleküle für die Migration von Lymphozyten zusammengetragen (Bradley and Watson 1996). Eine Untersuchung der Chemokinrezeptoren und andere für die Migration wichtigen Moleküle wären erstrebenswert, um den Einfluss von SFA auf T-Zellen besser verstehen zu können.

6.6 *In vivo*-Migration nach SFA-Gabe

Die *in vitro* Migrations-Daten wurden *in vivo* an C57BL/6NCrl-Mäusen überprüft. „Skin-Painting“ bewirkt eine inflammatorische Bedingung in der Epidermis, so dass ansässige DCs zum Inguinallymphknoten wandern. Die *in vivo*-Gabe von SFA bei Mäusen bewirkte eine effektive verminderte Migration Dendritischer Zellen zum Lymphknoten im Vergleich zu Trägersubstanz-injizierten Tieren (Abbildung 5.20). Diese Daten untermauern, die untersuchten *in vitro*-DC-Migrationen. Diese Daten zeigen, dass SFA eine einzigartige Rolle bei der Abstimmung der DC-Rekrutierung zum Lymphknoten spielt. Die DC-Migration stellt einen wichtigen potenziellen klinischen Kontrollpunkt der immunsuppressiven Behandlung dar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Studie ein besseres Verständnis von Sanglifehrin A auf die DC-Migration zum Lymphknoten zulässt.

6.7 Ausblick auf die Klinische Anwendung von SFA

Seit ca. 25 Jahren wird Cyclosporin A zur immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantationen eingesetzt. Cyclosporin A hat wesentlich dazu beigetragen, dass sich Organtransplantationen zu Routineverfahren nach Organversagen entwickeln konnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Sanglifehrin A die *in vitro* und *in vivo* Migration Dendritischer Zellen inhibiert. Die Migration und die nachfolgende Immunantwort nehmen eine wichtige Stellung im Hinblick auf die Transplantatabstoßung ein. Eine modellierende Funktion von SFA auf die Migration Dendritischer- sowie von T-Zellen bietet die Möglichkeit, die angeborene und adaptive Immunantwort zu beeinflussen und eine Transplantationsabstoßung zu verhindern. Diese Bedeutung macht SFA zu einem innovativen und spannenden Therapeutikum. *In vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass eine kombinierte Gabe aus Cyclosporin A und SFA zu einem Langzeitüberleben des Transplantats im Ratten-Herz-Transplantationsmodell führt (Hackstein, Steinschulte et al. 2007). Sanglifehrin A könnte hierbei durch die Inhibition einiger Chemokine und Hemmung des CD38 in DCs eine entscheidende Rolle bei der verminderten Rekrutierung von Immunzellen spielen. Im Vergleich zu CsA, zeigt SFA nur eine schwache direkte Inhibition der T-Zellen (Zenke, Strittmatter et al. 2001), während CsA die Proliferation von T-Zellen in der *mixed leukocyte reaction* inhibieren und die IL-2 Transkriptionen blockieren kann (Halloran and Madrenas 1991). Dieses Zusammenspiel der unterschiedlichen Wirkweise der beiden Immunsuppressiva macht ihren kombinierten Einsatz sehr interessant. Zu den bereits erworbenen Kenntnissen gilt es weitere Studien anzuschließen, die das Potenzial und insbesondere die Toxizität des neuen Immunsuppressivums SFA weiter klären.

7 Literatur

- Alferink, J., I. Lieberam, et al. (2003). "Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen." J Exp Med **197**(5): 585-99.
- Allen, A., Y. Zheng, et al. (2004). "The novel cyclophilin binding compound, sanglifehrin A, disassociates G1 cell cycle arrest from tolerance induction." J Immunol **172**(8): 4797-803.
- Allen, S. J., S. E. Crown, et al. (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol **25**: 787-820.
- Alon, R. and S. Feigelson (2002). "From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts." Semin Immunol **14**(2): 93-104.
- Alon, R., V. Grabovsky, et al. (2003). "Chemokine induction of integrin adhesiveness on rolling and arrested leukocytes local signaling events or global stepwise activation?" Microcirculation **10**(3-4): 297-311.
- Ansel, K. M., V. N. Ngo, et al. (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." Nature **406**(6793): 309-14.
- Appay, V. and S. L. Rowland-Jones (2001). "RANTES: a versatile and controversial chemokine." Trends Immunol **22**(2): 83-7.
- Arenberg, D. A., E. S. White, et al. (2001). "Improved survival in tumor-bearing SCID mice treated with interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10)." Cancer Immunol Immunother **50**(10): 533-8.
- Bachmann, M. F., M. Kopf, et al. (2006). "Chemokines: more than just road signs." Nat Rev Immunol **6**(2): 159-64.
- Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, et al. (2001). "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment." J Exp Med **193**(9): 1105-12.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-8.
- Banas, B., M. Wornle, et al. (2002). "Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis." J Immunol **168**(9): 4301-7.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Barbet, G., M. Demion, et al. (2008). "The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells." Nat Immunol **9**(10): 1148-56.
- Belperio, J. A., M. P. Keane, et al. (2003). "Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection." J Immunol **171**(9): 4844-52.
- Belperio, J. A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Lynch III, J.P., Zisman, D.A., Xue, Y.Y., Li, K., Ardehali, A., Ross, D.J., Strieter, R.M. (2003). "Role of CXCL9/CXCR3 Chemokine Biology during Pathogenesis of Acute Lung Allograft Rejection." The Journal of Immunology **171**: 4844-4852.

- Bonecchi, R., G. Bianchi, et al. (1998). "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." J Exp Med **187**(1): 129-34.
- Bradley, L. M. and S. R. Watson (1996). "Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets." Curr Opin Immunol **8**(3): 312-20.
- Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." Science **272**(5258): 60-6.
- Cattaneo, D., N. Perico, et al. (2004). "Nephrotoxic aspects of cyclosporine." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 234S-239S.
- Caux, C., S. Ait-Yahia, et al. (2000). "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." Springer Semin Immunopathol **22**(4): 345-69.
- Chapman, J. R. and B. J. Nankivell (2006). "Nephrotoxicity of ciclosporin A: short-term gain, long-term pain?" Nephrol Dial Transplant **21**(8): 2060-3.
- Charo, I. F. and R. M. Ransohoff (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." N Engl J Med **354**(6): 610-21.
- Chicha, L., D. Jarrossay, et al. (2004). "Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations." J Exp Med **200**(11): 1519-24.
- Choi, S. W., G. C. Hildebrandt, et al. (2007). "CCR1/CCL5 (RANTES) receptor-ligand interactions modulate allogeneic T-cell responses and graft-versus-host disease following stem-cell transplantation." Blood **110**(9): 3447-55.
- Cinamon, G., V. Grabovsky, et al. (2001). "Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow." J Leukoc Biol **69**(6): 860-6.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, et al. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-5.
- Colotta, F., S. K. Dower, et al. (1994). "The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1." Immunol Today **15**(12): 562-6.
- Comalada, M., A. F. Vallerdo, et al. (2003). "Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases." Eur J Immunol **33**(11): 3091-100.
- Coss, M. C., R. M. Stephens, et al. (1998). "The immunophilin FKBP65 forms an association with the serine/threonine kinase c-Raf-1." Cell Growth Differ **9**(1): 41-8.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-102.
- D'Ambrosio, D., P. Panina-Bordignon, et al. (2003). "Chemokine receptors in inflammation: an overview." J Immunol Methods **273**(1-2): 3-13.
- Damsker, J. M., M. I. Bukrinsky, et al. (2007). "Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A." J Leukoc Biol **82**(3): 613-8.
- Daun, J. M., R. W. Ball, et al. (1999). "Aspirin-induced increases in soluble IL-1 receptor type II concentrations in vitro and in vivo." J Leukoc Biol **65**(6): 863-6.
- Delgado, E., V. Finkel, et al. (1998). "Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several beta-chemokines." Immunobiology **198**(5): 490-500.

- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, et al. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." *J Exp Med* **188**(2): 373-86.
- Fedele, G., L. Frasca, et al. (2004). "CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction." *Eur J Immunol* **34**(5): 1342-50.
- Fischer, M. B., I. Hauber, et al. (1994). "A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency." *Blood* **84**(12): 4234-41.
- Förster, R., T. Emrich, et al. (1994). "Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells." *Blood* **84**(3): 830-40.
- Förster, R., A. E. Mattis, et al. (1996). "A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen." *Cell* **87**(6): 1037-47.
- Förster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." *Cell* **99**(1): 23-33.
- Freeman, C. M., V. R. Stolberg, et al. (2006). "CCR4 participation in Th type 1 (mycobacterial) and Th type 2 (schistosomal) anamnestic pulmonary granulomatous responses." *J Immunol* **177**(6): 4149-58.
- Fulkerson, P. C., N. Zimmermann, et al. (2004). "Pulmonary chemokine expression is coordinately regulated by STAT1, STAT6, and IFN-gamma." *J Immunol* **173**(12): 7565-74.
- Furukawa, H., K. Nakamura, et al. (2004). "Enhanced TARC production by dust-mite allergens and its modulation by immunosuppressive drugs in PBMCs from patients with atopic dermatitis." *J Dermatol Sci* **35**(1): 35-42.
- Gouwy, M., S. Struyf, et al. (2005). "Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(6): 561-80.
- Grabovsky, V., S. Feigelson, et al. (2000). "Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions." *J Exp Med* **192**(4): 495-506.
- Hackstein, H., A. E. Morelli, et al. (2001). "Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles." *Trends Immunol* **22**(8): 437-42.
- Hackstein, H., C. Steinschulte, et al. (2007). "Sanglifehrin A blocks key dendritic cell functions in vivo and promotes long-term allograft survival together with low-dose CsA." *Am J Transplant* **7**(4): 789-98.
- Halloran, P. F. and J. Madrenas (1991). "The mechanism of action of cyclosporine: a perspective for the 90's." *Clin Biochem* **24**(1): 3-7.
- Hancock, W. W., Lu, B., Gao, W., Csizmadia, V., Faia, K., King, J.A., Smiley, S.T., Linq, M., Gerard, N.P., Gerard, C. (2000). "Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection." *J Exp Med* **192**(10): 1515-20.
- Henry, C. J., D. A. Ornelles, et al. (2008). "IL-12 Produced by Dendritic Cells Augments CD8+ T Cell Activation through the Production of the Chemokines CCL1 and CCL17." *J Immunol* **181**(12): 8576-84.

- Hintzen, C., C. Haan, et al. (2008). "Oncostatin M-induced and constitutive activation of the JAK2/STAT5/CIS pathway suppresses CCL1, but not CCL7 and CCL8, chemokine expression." J Immunol **181**(10): 7341-9.
- Imai, T., M. Baba, et al. (1997). "The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4." J Biol Chem **272**(23): 15036-42.
- Inaba, K. (1997). "Dendritic cells as antigen-presenting cells in vivo." Immunol Cell Biol **75**(2): 206-8.
- Jacobs, B., M. Wuttke, et al. (2008). "Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells." Horm Metab Res **40**(2): 99-107.
- Johnson, R. W., H. Kreis, et al. (2001). "Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure." Transplantation **72**(5): 777-86.
- Kanda, N., T. Shimizu, et al. (2007). "IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes." Eur J Immunol **37**(2): 338-50.
- Kapoor, S. (2008). "Association of chemokine CCL5 and systemic malignancies." J Hum Genet **53**(5): 377-8.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.
- Keane, M. P., T. J. Standiford, et al. (1997). "Chemokines are important cytokines in the pathogenesis of interstitial lung disease." Eur Respir J **10**(6): 1199-202.
- Kinter, A., A. Catanzaro, et al. (1998). "CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11880-5.
- Kligman, L. H. (1994). "Rapid assay of the anti-inflammatory activity of topical corticosteroids by inhibition of a UVA-induced neutrophil infiltration in hairless mouse skin. II. Assessment of name brand versus generic potency." Acta Derm Venereol **74**(1): 18-9.
- Ko, H., B. D. Hambly, et al. (2008). "Dendritic cell derived IL-18 production is inhibited by rapamycin and sanglifehrin A, but not cyclosporine A." Transpl Immunol **20**(1-2): 99-105.
- Koch, A. E., M. V. Volin, et al. (2001). "Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint." Arthritis Rheum **44**(1): 31-40.
- Kriehuber, E., S. Breiteneder-Geleff, et al. (2001). "Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages." J Exp Med **194**(6): 797-808.
- Kusumoto, M., B. Xu, et al. (2007). "Expression of chemokine receptor CCR4 and its ligands (CCL17 and CCL22) in murine contact hypersensitivity." J Interferon Cytokine Res **27**(11): 901-10.
- Lee, B. S., S. M. Shim, et al. (2007). "Wogonin suppresses TARC expression induced by mite antigen via heme oxygenase 1 in human keratinocytes. Suppressive effect of wogonin on mite antigen-induced TARC expression." J Dermatol Sci **46**(1): 31-40.
- Lehner, T. (2002). "The role of CCR5 chemokine ligands and antibodies to CCR5 coreceptors in preventing HIV infection." Trends Immunol **23**(7): 347-51.

- Lieberman, I. and I. Förster (1999). "The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4⁺ T cells." Eur J Immunol **29**(9): 2684-94.
- Luster, A. D. (2002). "The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity." Curr Opin Immunol **14**(1): 129-35.
- Maghazachi, A. A. (2003). "G protein-coupled receptors in natural killer cells." J Leukoc Biol **74**(1): 16-24.
- Mantovani, A., M. Locati, et al. (2001). "Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines." Trends Immunol **22**(6): 328-36.
- Manz, M. G., D. Traver, et al. (2001). "Dendritic cell development from common myeloid progenitors." Ann N Y Acad Sci **938**: 167-73; discussion 173-4.
- Martins, L., A. Ventura, et al. (2004). "Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity?" Transplant Proc **36**(4): 877-9.
- Mikhak, Z., C. M. Fleming, et al. (2006). "STAT1 in peripheral tissue differentially regulates homing of antigen-specific Th1 and Th2 cells." J Immunol **176**(8): 4959-67.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, et al. (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." Nature **395**(6697): 82-6.
- Moore, K. J., T. Wada, et al. (1998). "Gene transfer of RANTES elicits autoimmune renal injury in MRL-Fas(1pr) mice." Kidney Int **53**(6): 1631-41.
- Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-8.
- Nakano, H. and M. D. Gunn (2001). "Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation." J Immunol **166**(1): 361-9.
- Nazari, R. and S. Joshi (2008). "CCR5 as target for HIV-1 gene therapy." Curr Gene Ther **8**(4): 264-72.
- Ngo, V. N., H. L. Tang, et al. (1998). "Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells." J Exp Med **188**(1): 181-91.
- Ohara, K., R. Billington, et al. (1990). "Toxicologic evaluation of FK 506." Transplant Proc **22**(1): 83-6.
- Okada, T., V. N. Ngo, et al. (2002). "Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches." J Exp Med **196**(1): 65-75.
- Partida-Sanchez, S., S. Goodrich, et al. (2004). "Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity." Immunity **20**(3): 279-91.
- Penna, G., M. Vulcano, et al. (2002). "Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **169**(12): 6673-6.
- Penna, G., M. Vulcano, et al. (2002). "Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1164-71.
- Penton-Rol, G., S. Orlando, et al. (1999). "Bacterial lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA expression, of the IL-1 type II

- receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts." *J Immunol* **162**(5): 2931-8.
- Piqueras, B., J. Connolly, et al. (2006). "Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors." *Blood* **107**(7): 2613-8.
- Randolph, G. J., J. Ochando, et al. (2008). "Migration of dendritic cell subsets and their precursors." *Annu Rev Immunol* **26**: 293-316.
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." *Annu Rev Immunol* **18**: 217-42.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (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**(4): 1109-18.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1999). "Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation." *J Exp Med* **189**(4): 611-4.
- Sallusto, F., A. Lanzavecchia, et al. (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses." *Immunol Today* **19**(12): 568-74.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." *J Exp Med* **187**(6): 875-83.
- Sallusto, F., B. Palermo, et al. (1999). "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." *Eur J Immunol* **29**(5): 1617-25.
- Sanchez-Tillo, E., M. Wojciechowska, et al. (2006). "Cyclophilin A is required for M-CSF-dependent macrophage proliferation." *Eur J Immunol* **36**(9): 2515-24.
- Sanglier, J. J., V. Quesniaux, et al. (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity." *J Antibiot (Tokyo)* **52**(5): 466-73.
- Schall, T. J. and K. B. Bacon (1994). "Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation." *Curr Opin Immunol* **6**(6): 865-73.
- Schluger, N. W. and W. N. Rom (1997). "Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation." *Curr Opin Immunol* **9**(4): 504-8.
- Shi, G., S. Partida-Sanchez, et al. (2007). "Identification of an alternative G{alpha}q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes." *J Exp Med* **204**(11): 2705-18.
- Shigematsu, H., B. Reizis, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin." *Immunity* **21**(1): 43-53.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nat Rev Immunol* **2**(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." *Nat Rev Immunol* **7**(1): 19-30.

- Sordi, V., G. Bianchi, et al. (2006). "Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin." Transplantation **82**(6): 826-34.
- Sozzani, S., P. Allavena, et al. (1998). "Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties." J Immunol **161**(3): 1083-6.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-14.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinschulte, C., T. Taner, et al. (2003). "Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells." J Immunol **171**(2): 542-6.
- Strieter, R. M. and J. A. Belperio (2001). "Chemokine receptor polymorphism in transplantation immunology: no longer just important in AIDS." Lancet **357**(9270): 1725-6.
- Tanaka, Y., D. H. Adams, et al. (1993). "T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta." Nature **361**(6407): 79-82.
- Thelen, M. and J. V. Stein (2008). "How chemokines invite leukocytes to dance." Nat Immunol **9**(9): 953-9.
- Traver, D., K. Akashi, et al. (2000). "Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor." Science **290**(5499): 2152-4.
- Trinchieri, G., S. Pflanz, et al. (2003). "The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses." Immunity **19**(5): 641-4.
- Turley, S. J., K. Inaba, et al. (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." Science **288**(5465): 522-7.
- Usluoglu, N., J. Pavlovic, et al. (2007). "RIP2 mediates LPS-induced p38 and IkappaBalpha signaling including IL-12 p40 expression in human monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **37**(8): 2317-25.
- Vassileva, G., H. Soto, et al. (1999). "The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes." J Exp Med **190**(8): 1183-8.
- Vissers, J. L., F. C. Hartgers, et al. (2001). "Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo." J Leukoc Biol **69**(5): 785-93.
- Webb, L. M., M. U. Ehrenguber, et al. (1993). "Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7158-62.
- Wu, M. J., K. H. Shu, et al. (2004). "Sirolimus in chronic allograft nephropathy." Transplant Proc **36**(7): 2053-5.
- Yanagihara, S., E. Komura, et al. (1998). "EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation." J Immunol **161**(6): 3096-102.
- Yu, P. W., L. A. Schuler, et al. (1997). "Effects of dexamethasone treatment on IL-1 receptor mRNA levels in vivo." J Leukoc Biol **62**(3): 401-4.

- Zenke, G., U. Strittmatter, et al. (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." J Immunol **166**(12): 7165-71.
- Zhang, L. H. and J. O. Liu (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle." J Immunol **166**(9): 5611-8.
- Zhang, L. H., H. D. Youn, et al. (2001). "Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sanglifehrin A is mediated through the NFkappa B-dependent activation of p53." J Biol Chem **276**(47): 43534-40.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	h	Stunden
°C	Grad Celsius	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
μ	Mikro (10 ⁻⁶)	IFN	Interferon
APC	Antigenpräsentierende Zelle	Ig	Immunglobulin
APC	Allophycocyanin	IL	Interleukin
BSA	Bovines Serumalbumin	IP-10	IFNγ-inducible protein
Ca ²⁺	Calcium-Ion	IU	Internationale Einheit
CCL	Chemokinligand mit dem Motiv CC	IκB	inhibitory protein kappa B
CCR	Chemokinrezeptor mit dem Motiv CC	KG	Körpergewicht
CD	Cluster of Differentiation	L	Liter
cDNA/RNA	komplementäre DNA bzw. RNA	LD ₅₀	Lethale Dosis, bei der 50 % der Tiere gestorben sind
CMV	Cytomegalie-Virus	lods	log odds-ratio
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	LPS	Lipopolysaccharid
CsA	Cyclosporin A	m	Milli (10 ⁻³)
CSF	Koloniestimulierender Faktor	M	Molar (mol/L)
CXCL	Chemokinligand mit Motiv CXC	MACS	Magnetic-Activated Cell Sorter
CXCR	Rezeptor des CXCL	MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
Cy	Cyanin	mDC	myeloide DC
CypA	Cyclophilin A	MEK	MAP/ERK-Kinase
DC	Dendritische Zelle	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MIG	monokine induced by IFNγ
ds	doppelsträngig	min	Minuten
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	mRNA	messenger RNA
ERK	extrazellulär regulierte Kinase	mTOR	mammalian target of Rapamycin
FACS	fluorescence activating cell scanning or sorting	MW	Mittelwert
FCS	Fötales Kälberserum	n	Nano (10 ⁻⁹)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat	NFAT	nuclear factor of activated t-cells
FKBP	FK506 binding protein	NF-κB	Nuclear Factor-κB
FSC	forward scatter	NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
g	Gramm	p	Piko (10 ⁻¹²)
G1-Phase	gap1-Phase		
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-CSF		

PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PG	Proteoglykan
PRR	Pattern Recognition Receptor
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SEM	Standardfehler
SFA	Sanglifehrin A
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
S-Phase	Synthese-Phase
ss	einzelsträngig
SSC	sideward scatter
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF Rezeptor Assoziierter Faktor

9 Anhang

9.1 Microarray-Daten

Tabelle 9.1 Signifikant regulierte Gene nach Sanglifehrin A-Behandlung und LPS-Stimulation Dendritischer Zellen im Vergleich mit Trägersubstanz-behandelten und LPS-stimulierten DCs. Sortiert nach den Iods sind der Name, die „accession“ Nummer, Koeffizient, p-Wert und Iods angegeben.

1	Symbol	Accession	Koeffizient	p-Wert	Iods
2	C20orf139	NM_080725	2,30450453	2E-11	14,5464151
3	TRADD	NM_153425	-2,1104108	1,5E-10	13,5479985
4	ZFYVE26	NM_015346	-1,53618093	1,94E-10	13,4071293
5	SREBF1	NM_004176	-1,48385895	2,57E-10	13,2400002
6	H2AFZ	NM_002106	-2,03336999	5,52E-10	12,7634012
7	FDPS	NM_002004	-2,17775207	8,88E-10	12,4472005
8	HIST2H2AA	NM_003516	-2,74319355	1,52E-09	12,0707581
9	SYNGR2	AL833010	-1,98332803	1,45E-09	11,9348183
10	CCL5	NM_002985	-2,91882681	1,78E-09	11,796476
11	CLNS1A	NM_001293	-1,46452988	2,71E-09	11,6490435
12	C19orf6	NM_033420	-1,61257382	4,46E-09	11,268054
13	NMES1	NM_032413	-2,62963467	3,41E-09	11,149694
14	ACP5	NM_001611	2,26493839	5,31E-09	11,1309303
15	ECGF1	NM_001953	-1,47206746	6,8E-09	10,9323441
16	AKT2	BC022779	-1,53428377	6,86E-09	10,9263115
17	SRI	NM_003130	-2,85045652	6,87E-09	10,9255129
18	A_24_P392351	A_24_P392351	1,06496806	9,36E-09	10,6682466
19	C14orf123	NM_014169	-1,32740646	9,47E-09	10,665012
20	MT1J	NM_175622	-1,89101201	1,42E-08	10,3213144
21	NDUFC1	NM_002494	-1,5292167	1,9E-08	10,0799001
22	DKFZp564K142	NM_032121	-2,02385185	1,96E-08	10,054787
23	C7orf28B	NM_198097	-1,19424987	2,01E-08	10,0312329
24	C19orf28	NM_174983	-2,10464361	2,08E-08	10,0011686
25	DNASE1L3	NM_004944	1,81805465	2,24E-08	9,93999691
26	A_23_P21882	A_23_P21882	-1,16838612	2,53E-08	9,82903939
27	HIST1H2AD	NM_021065	-2,09401673	2,67E-08	9,78507048
28	CCL17	NM_002987	-2,40759277	4,89E-09	9,75555305

29	RGC32	NM_014059	1,7213966	3,09E-08	9,65835458
30	BST2	NM_004335	-1,94754859	3,14E-08	9,64389492
31	IMPDH1	NM_000883	-1,2271077	3,19E-08	9,62976047
32	TFRC	NM_003234	-2,6136716	3,28E-08	9,60620323
33	A_24_P850336	A_24_P850336	-1,68365324	3,49E-08	9,55113886
34	AK092544	AK092544	1,05504543	3,54E-08	9,53841713
35	IL1R2	NM_004633	2,84407648	3,78E-08	9,47934738
36	EBI3	NM_005755	-3,07772027	3,81E-08	9,47241363
37	AL137354	AL137354	0,83074189	3,89E-08	9,45394627
38	BCAP31	NM_005745	0,87953526	4,25E-08	9,37502583
39	RPL23AP7	NR_000029	0,77821997	4,3E-08	9,36476034
40	A_32_P101860	A_32_P101860	-2,3097001	4,5E-08	9,32554272
41	SERPINA1	NM_000295	-1,24660881	4,58E-08	9,30936238
42	ADAM19	NM_033274	-1,63394935	4,65E-08	9,27981519
43	H2AFZ	NM_002106	-2,0768068	4,99E-08	9,23243727
44	A_24_P358305	A_24_P358305	1,04967506	5,02E-08	9,22586964
45	G1P3	NM_022873	-2,26159085	5,07E-08	9,21734177
46	HLA-A	NM_002116	-1,08996879	5,17E-08	9,20052544
47	A_24_P315405	A_24_P315405	-1,71662857	5,21E-08	9,19323721
48	ENST00000309379	ENST00000309379	1,04127679	5,31E-08	9,17435361
49	MT1E	NM_175617	-2,28190745	5,37E-08	9,16646115
50	OSBPL9	NM_148909	-1,1811958	5,45E-08	9,15223843
51	HMG3	NM_138730	-1,60007137	5,61E-08	9,12554612
52	FLJ10350	NM_018067	0,96025855	5,79E-08	9,09687684
53	A_24_P204454	A_24_P204454	1,00428701	6,11E-08	9,04842056
54	GMFG	NM_004877	1,30989131	6,23E-08	9,03093618
55	AW977362	AW977362	-1,59683044	6,33E-08	9,01683405
56	THC2122216	THC2122216	0,79103191	6,48E-08	8,99526523
57	A_24_P929974	A_24_P929974	0,8878542	6,51E-08	8,99096375
58	ENST00000293569	ENST00000293569	-1,59235067	6,6E-08	8,97820874
59	EIF4A1	NM_001416	1,29959616	6,78E-08	8,95449711
60	THC2094919	THC2094919	-1,19218633	6,79E-08	8,95313764
61	CXCL9	NM_002416	-2,96228738	6,92E-08	8,93523127
62	NIPSNAP3A	NM_015469	-1,05114096	6,95E-08	8,93099585
63	PSMB10	NM_002801	-2,06984711	7,11E-08	8,91009719
64	ALOX15B	NM_001141	-2,10648126	7,2E-08	8,8990682
65	SPCS2	NM_014752	-1,0792829	7,82E-08	8,82266248

66	FOXP1	NM_032682	-1,07930386	8,06E-08	8,79589265
67	LOC390842	XM_497583	0,81948335	8,07E-08	8,79452331
68	STK4	BC005231	0,73439971	8,19E-08	8,78110332
69	ADA	NM_000022	-2,14394371	8,23E-08	8,7758309
70	A_24_P255654	A_24_P255654	1,24157106	8,36E-08	8,76124296
71	KIAA0323	NM_015299	-0,74843347	8,79E-08	8,71576805
72	MT2A	NM_005953	-2,04039686	8,36E-08	8,64548477
73	MT2A	NM_005953	-1,9931028	9,31E-08	8,63501262
74	FAM10A5	NM_153291	0,63070073	1,03E-07	8,5705719
75	CD38	NM_001775	-2,20949714	1,06E-07	8,54457309
76	SOX4	NM_003107	-1,22658843	1,07E-07	8,53736434
77	ARPC5	NM_005717	-1,22375153	1,07E-07	8,53190453
78	HIST1H2AE	NM_021052	-1,81372454	1,08E-07	8,52536788
79	AF217993	AF217993	-1,83342173	1,17E-07	8,45168693
80	THC2165334	THC2165334	1,41480515	1,21E-07	8,42017079
81	TUBB2	NM_001069	-1,82339496	1,22E-07	8,41293023
82	LDLR	NM_000527	-1,2960762	1,26E-07	8,3777453
83	SERPINB1	NM_030666	-1,8713119	1,27E-07	8,37568748
84	SNX14	NM_153816	-1,20423116	1,27E-07	8,37489171
85	SNFT	NM_018664	-1,85125508	0,00000013	8,35462125
86	OAS1	NM_002534	-1,11071211	0,00000013	8,35268672
87	CD52	NM_001803	1,21649979	1,32E-07	8,33405148
88	DKFZP564B167	NM_015415	-0,78764272	1,33E-07	8,33326894
89	MT1G	NM_005950	-2,03449915	0,00000014	8,28127393
90	TINF2	NM_012461	-1,18056119	1,45E-07	8,24661426
91	ICF45	NM_017872	-0,67504076	1,57E-07	8,17179155
92	C6orf111	NM_032870	-1,35389843	1,59E-07	8,15943089
93	LAG3	NM_002286	-2,1285044	1,67E-07	8,11657851
94	HLA-A	NM_002116	-1,3811112	1,68E-07	8,11172661
95	DNCL1	NM_003746	-1,3082901	0,00000017	8,09849394
96	MARS	NM_004990	-0,86378096	0,00000017	8,0965725
97	GBP4	NM_052941	-1,45492097	1,71E-07	8,09417102
98	HNRPC	NM_031314	1,29820007	1,74E-07	8,07440302
99	RARA	NM_000964	0,87246797	1,77E-07	8,06195272
100	TUBB6	NM_032525	-1,09637618	1,78E-07	8,05333199
101	ENST00000309746	ENST00000309746	1,42016616	1,79E-07	8,04844278
102	A_24_P401160	A_24_P401160	1,20813335	0,00000018	8,04551683

103	SEMA4C	NM_017789	-1,22866807	1,85E-07	8,02040438
104	TGFBI	NM_000358	1,84423924	1,87E-07	8,01008849
105	CKB	NM_001823	-1,60144512	0,00000019	7,99437107
106	STX4A	NM_004604	-0,97088946	1,94E-07	7,9751215
107	INDO	NM_002164	-2,23664244	1,81E-07	7,96185751
108	EDF1	NM_153200	-1,62463588	1,97E-07	7,96023501
109	FAM11A	NM_032508	-0,63055324	1,99E-07	7,95056001
110	OSCAR	NM_130771	-2,19581956	2,05E-07	7,92203683
111	CHR2SYT	NM_020728	0,87576603	0,00000021	7,89761482
112	MT1A	NM_005946	-1,57983103	2,21E-07	7,84691185
113	PI4K2B	NM_018323	-0,9592245	2,25E-07	7,83069301
114	NDRG2	NM_201535	1,90775428	2,26E-07	7,82827381
115	CRIP1	NM_001311	-1,28409966	2,26E-07	7,82727514
116	A_24_P161317	A_24_P161317	1,06355683	2,27E-07	7,82329344
117	MT1X	NM_005952	-1,79235632	2,35E-07	7,79061518
118	HSD11B1	NM_181755	-1,57310458	2,36E-07	7,78640344
119	SMARCC2	NM_139067	-1,29075835	2,38E-07	7,77872003
120	BF	NM_001710	-3,49647657	0,00000024	7,77072261
121	PABPN1	NM_004643	-2,24794676	2,47E-07	7,74267905
122	SIDT2	NM_015996	-1,94053177	2,52E-07	7,72119689
123	HNRPC	NM_031314	0,61119431	2,53E-07	7,71911517
124	H2AFZ	NM_002106	-2,0855746	2,54E-07	7,71683934
125	A_23_P370707	A_23_P370707	-1,5795837	2,61E-07	7,68809303
126	PP2447	NM_025204	-1,58485652	2,62E-07	7,68541601
127	STOML1	NM_004809	-1,06286016	2,64E-07	7,67987387
128	ARHGAP1	NM_004308	-0,60421318	2,65E-07	7,67531264
129	HLA-G	ENST00000355804	-1,20040722	2,71E-07	7,65355169
130	RALBP1	NM_006788	-0,60381839	2,71E-07	7,65184046
131	C1orf38	NM_004848	-1,54533297	2,73E-07	7,64739446
132	A_24_P92267	A_24_P92267	0,71701029	2,75E-07	7,63960928
133	JAK3	BC028068	-3,14795644	2,77E-07	7,63084109
134	D15Wsu75e	CR456458	-1,39249957	2,79E-07	7,62559
135	ENST00000326693	ENST00000326693	-1,97920556	2,81E-07	7,61854942
136	TXN	NM_003329	-1,78216606	1,52E-07	7,61086598
137	CLECSF12	NM_022570	1,52791359	2,89E-07	7,59001541
138	LAD1	NM_005558	-1,9097481	2,95E-07	7,5713916
139	OSBPL5	NM_020896	-0,78973355	3,05E-07	7,5397535

140	EBI3	NM_005755	-1,17740322	3,05E-07	7,53900742
141	AF287958	AF287958	-1,13585848	3,11E-07	7,52037327
142	TZFP	NM_014383	-2,11030694	0,00000032	7,4935712
143	FLJ22794	NM_022074	-1,09268221	3,24E-07	7,47978453
144	PSMB9	NM_002800	-1,22552924	3,27E-07	7,47101439
145	TNFRSF14	NM_003820	-2,11272333	3,28E-07	7,46747477
146	ELMO2	NM_133171	-1,45013771	0,00000033	7,46342803
147	PTPRE	NM_006504	1,76638534	3,31E-07	7,46032196
148	AQP9	NM_020980	-2,11104184	3,31E-07	7,45987921
149	ZNF9	NM_003418	1,18488913	3,32E-07	7,45571288
150	PTPRE	NM_006504	2,34843326	3,41E-07	7,43207763
151	TIMELESS	NM_003920	-0,96270279	3,42E-07	7,42900062
152	RAB7L1	NM_003929	-1,12737702	3,59E-07	7,38197823
153	CCL1	NM_002981	2,46568387	3,66E-07	7,3617524
154	LOC115294	NM_052937	-0,84062062	3,67E-07	7,36091602
155	AK128882	AK128882	-1,37319243	3,72E-07	7,34611205
156	A_24_P254933	A_24_P254933	-1,05243127	3,74E-07	7,34231128
157	LPIN2	NM_014646	-1,2198715	3,74E-07	7,34122823
158	A_24_P272735	A_24_P272735	0,9426096	0,00000038	7,32671031
159	IFI27	NM_005532	-1,54198931	3,83E-07	7,31874284
160	FNBP1	NM_015033	-1,5058193	3,99E-07	7,27868346
161	FLJ35429	AK092748	1,01143882	4,03E-07	7,26928488
162	MT1H	NM_005951	-1,8368583	4,09E-07	7,25477737
163	CTNNA1	NM_001903	-0,62201462	4,12E-07	7,24630106
164	C3orf18	NM_016210	-2,3218594	4,16E-07	7,23754222
165	CLECSF14	NM_006344	2,10719156	0,00000042	7,22751253
166	MTMR4	NM_004687	-1,59000245	4,25E-07	7,21624002
167	TncRNA	AK027191	-1,37602116	4,27E-07	7,21101875
168	NCE2	NM_080678	-1,08256514	4,33E-07	7,19864102
169	pp9099	NM_025201	1,50475795	4,34E-07	7,19634125
170	RPL23AP7	NR_000029	0,69277913	4,54E-07	7,15220233
171	SOCS2	NM_003877	-1,52939501	4,58E-07	7,14305095
172	RNASE6	NM_005615	1,74712514	4,59E-07	7,14153285
173	CCL19	NM_006274	-3,61368572	4,61E-07	7,135994
174	SQLE	NM_003129	-1,58108286	4,64E-07	7,13020875
175	GCA	NM_012198	-0,89357453	4,68E-07	7,12313252
176	MT2A	BC007034	-2,15406241	4,74E-07	7,10423974

177	SCO2	NM_005138	0,78894938	4,82E-07	7,09326912
178	A_24_P862524	A_24_P862524	1,14667079	4,92E-07	7,07346088
179	A_24_P41979	A_24_P41979	0,82072742	4,94E-07	7,07015581
180	A_23_P165819	A_23_P165819	-1,56365664	4,95E-07	7,06834992
181	ENST00000312855	ENST00000312855	-0,91742685	4,96E-07	7,06636866
182	STAT6	NM_003153	-1,64503418	4,96E-07	7,06570836
183	A_32_P100338	A_32_P100338	-1,40600683	4,96E-07	7,0650836
184	LOC93082	NM_138397	-2,08932422	5,04E-07	7,05046872
185	BCL2L14	NM_030766	-1,65894643	5,06E-07	7,04506513
186	PP	NM_021129	-1,84693441	5,07E-07	7,04427223
187	TPM4	NM_003290	1,36788067	5,08E-07	7,04223628
188	FBXL15	BC036120	-1,27775978	5,25E-07	7,00941159
189	SERF1B	NM_022978	-1,11572841	5,25E-07	7,00886741
190	HLA-F	NM_018950	-1,5786241	5,39E-07	6,98330822
191	AIF1	NM_004847	1,53103701	5,55E-07	6,95511146
192	CSTA	NM_005213	-2,11930638	5,55E-07	6,95478605
193	PITPNA	NM_006224	-1,96611134	5,61E-07	6,94534483
194	PTGIR	NM_000960	-2,43814569	5,82E-07	6,90870532
195	OCIL	NM_013269	-1,95405719	5,84E-07	6,90505177
196	M64259	M64259	-0,82817791	5,86E-07	6,90214185
197	BC035647	BC035647	-1,54119435	5,86E-07	6,900433
198	BHLHB5	NM_152414	-1,88232351	0,00000059	6,89465167
199	MRPS6	NM_032476	-2,06006848	5,91E-07	6,89385652
200	DNAJB11	NM_016306	1,01026598	6,06E-07	6,86776157
201	FLJ22833	NM_022837	-1,43027627	6,15E-07	6,85335949
202	FKBP3	NM_002013	-2,19074348	6,32E-07	6,82704403
203	AIM2	NM_004833	-1,90969588	6,39E-07	6,81600547
204	B3GALT4	NM_003782	-0,80289629	0,00000064	6,81409249
205	A_24_P521662	A_24_P521662	0,76788526	6,45E-07	6,80738376
206	MT1L	X97261	-1,83169012	6,59E-07	6,78508593
207	AF391805	AF391805	0,78812477	6,79E-07	6,75613236
208	IFI27	NM_005532	-1,51406073	6,79E-07	6,7552701
209	FLJ21908	NM_024604	-0,78241323	0,00000068	6,75468173
210	GBP3	NM_018284	-1,72488144	7,03E-07	6,72127938
211	PRAME	NM_006115	-1,41194126	7,09E-07	6,71350418
212	NCE2	NM_080678	-1,14766692	7,14E-07	6,70629694
213	B3GALT6	NM_080605	-1,57031277	7,18E-07	6,70072342

214	RPL30	NM_000989	1,07269444	7,24E-07	6,69241492
215	OCIL	NM_013269	-0,94607257	7,25E-07	6,69119397
216	RPL26L1	NM_016093	0,68917364	7,27E-07	6,68857263
217	HLA-E	NM_005516	-1,04671198	7,38E-07	6,67369108
218	THC2121858	THC2121858	-1,69130943	7,46E-07	6,66245415
219	PMPCB	NM_004279	-1,41259598	7,58E-07	6,64731658
220	RPS14	NM_005617	1,1251832	7,61E-07	6,64312124
221	TCTEL1	NM_006519	-1,85711003	7,69E-07	6,63309238
222	MT1X	NM_005952	-1,89040925	7,74E-07	6,62617692
223	IFI27	NM_005532	-1,49017852	7,75E-07	6,62521344
224	F13A1	NM_000129	1,8402479	0,00000078	6,61809169
225	FGL2	NM_006682	1,77951044	0,00000081	6,58101027
226	LY75	NM_002349	-2,03959705	8,24E-07	6,56401635
227	MKNK2	NM_017572	-2,16130681	8,29E-07	6,55807497
228	IFI27	NM_005532	-1,41121656	0,00000084	6,54526084
229	ASCL2	NM_005170	-1,5310871	8,61E-07	6,51999062
230	MAP3K6	NM_004672	-1,95032431	8,67E-07	6,51309332
231	A_23_P147404	A_23_P147404	-1,00156813	8,81E-07	6,49783209
232	PPT1	NM_000310	0,91478366	8,89E-07	6,48890591
233	HSF1	NM_005526	-1,78890158	8,92E-07	6,48568125
234	THC2132626	THC2132626	-1,58604485	9,09E-07	6,46678392
235	HSPA8	NM_006597	-1,48489937	9,25E-07	6,44913831
236	MVK	X75311	-1,99006379	9,44E-07	6,42917951
237	C6orf105	NM_032744	-0,8868639	9,46E-07	6,42631831
238	CCL26	NM_006072	1,57824239	9,72E-07	6,39939424
239	PFAAP5	NM_014887	-0,98092109	9,89E-07	6,38261868
240	C9orf19	NM_022343	-1,60259155	9,89E-07	6,38242482
241	A_24_P477475	A_24_P477475	0,96694644	0,00000102	6,35577436
242	ENST00000240349	ENST00000240349	0,62736925	0,00000102	6,35453225
243	PTPN12	NM_002835	1,47716377	0,00000103	6,34450059
244	MGC11324	NM_032717	2,61690115	0,00000103	6,34334265
245	LOC392382	XM_373311	0,53007509	0,00000106	6,3114739
246	BIC	NR_001458	-3,04501457	0,00000106	6,30906318
247	TNFRSF4	NM_003327	-1,53654788	0,00000107	6,30651537
248	A_24_P332441	A_24_P332441	1,00769264	0,00000109	6,2874003
249	IFI27	NM_005532	-1,40264696	0,0000011	6,27865838
250	A_24_P50666	A_24_P50666	-0,84363733	0,00000112	6,25885201

251	YEATS2	NM_018023	-1,37602841	0,00000113	6,25315206
252	PPP1R16B	NM_015568	-1,47686287	0,00000113	6,24702687
253	DDX39	NM_138998	1,30933863	0,00000113	6,24471664
254	LIPA	NM_000235	2,15441983	0,00000115	6,23759767
255	MICAL-L2	NM_024723	-1,94122359	0,00000114	6,23661727
256	RPS28	NM_001031	0,85270535	0,00000118	6,20821919
257	CHCHD7	NM_024300	-1,09622672	0,00000119	6,1961597
258	MOV10	NM_020963	-1,22632001	0,00000119	6,19470688
259	T3JAM	NM_025228	-2,21758108	0,00000121	6,18327267
260	BNIP3	NM_004052	-0,65245151	0,00000121	6,18243503
261	G1P2	NM_005101	-2,06179166	9,31E-07	5,75903554
262	HSPE1	NM_002157	-1,87713013	6,3964E-06	4,48080848
263	CXCL10	NM_001565	-1,27052552	7,6183E-05	1,87830683
264	EVER1	NM_007267	-0,74184861	0,00010068	1,58214987
265	SOCS3	NM_003955	-1,00866509	0,00013117	1,30073604
266	CD69	NM_001781	0,44271188	0,00013853	1,24268762
267	IFI44	NM_006417	-0,88955861	0,00014193	1,21686738
268	ICAM3	NM_002162	0,6563448	0,0001467	1,18163925
269	PSMA6	NM_002791	0,67572096	0,00016406	1,06254897
270	CD69	NM_001781	0,43198754	0,0001756	0,99021124
271	CD69	NM_001781	0,40562867	0,0002232	0,7346181
272	CD209	NM_021155	0,41505429	0,0002491	0,61758732

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein, der mir die Möglichkeit gab, diese spannende vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Besonderer Dank gilt seiner fachkundigen Unterstützung beim Verfassen der Publikation. Herrn Prof. Dr. Gregor Bein danke ich für die Schaffung optimaler Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich sowohl Herrn Bein als auch Herrn Hackstein für die Möglichkeit an Kongressen im In- und Ausland und an einer Fortbildung teilnehmen zu können danken.

Herrn Prof. Dr. Michael U. Martin danke ich für seine sofortige Betreuungszusage der Dissertation am Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig Universität Gießen und der Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke all meinen Kollegen/Innen und lieben Freunden des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für die erwiesene Hilfsbereitschaft und Rat in praktischen und fachlichen Fragen, namentlich: Dr. Tamam Bakchoul, Juliane Bechtel, Dr. Beate Berghöfer, Angela Briel, Gabriela Haley, Dr. Leo Hansmann, Dr. Karin Kissel, Christina Lang, Katja Müller, Angelika Nockher, Adriana Peric, Håkon Sandvold und Silke Werth. Außerdem danke ich den Tierpflegern Manuela Binz und Reinhard Winkler aus dem Zentralen Tierlabor der Universität Gießen für die Pflege der Tiere und ihre stets hilfsbereite und freundliche Art.

Dem Kooperationspartner aus dem Institut für Pathologie am Justus Liebig-Universitätsklinikum Gießen und Marburg (M.M. Stein, Dr. J. Wilhelm) danke ich für die gute Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden bedanken deren Warmherzigkeit, Inspiration und Motivation mein Leben bereichern und begleiten.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation mit dem Titel: „Untersuchung immunbiologischer Effekte von Sanglifehrin A bei dendritischen Zellen *in vitro* und *in vivo*“ selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ich habe bisher in keinem in- oder ausländischen naturwissenschaftlichem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.