

**Steuerelemente bei der Wanderung und
Funktion dendritischer Zellen:
Funktionelle Untersuchungen zu CCR7,
Sphingosin-1-Phosphat und CD83**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines**

**Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation
von**

**Dipl. Biochem. Niklas Czeloth
geb. 14.05.1976 in Kiel**

2007

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Koreferent: Prof. Dr. Reinhold Förster

Tag der Promotion: 04.10.2007

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Sphingolipids Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf dendritische Zellen (DC) untersucht. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass S1P Migration auf reifen, jedoch nicht auf unreifen *in vitro* generierten DC hervorruft. Aus Knochenmark differenzierte DC exprimieren bereits im unreifen Zustand die für S1P spezifischen Rezeptoren S1P_{2,3,4,5}. Durch einen Reifungsstimulus wird zusätzlich der Rezeptor S1P₁ exprimiert und S1P₃ stark heraufreguliert. Versuche mit spezifischen Toxinen konnten zeigen, dass die von S1P hervorgerufene Migration über das kleine G-Protein G_{αi} und die kleinen GTPasen Rho und Rac gesteuert wird. Eine Behandlung der DC *in vitro* mit der für S1P-Rezeptoren spezifischen Substanz FTY720 konnte die Wanderung von reifen DC auf S1P, jedoch nicht auf CCR7 Liganden beeinflussen. Die *in vitro* beobachtete Migration von DC auf S1P zeigte sich schließlich abhängig von S1P₃.

In vivo zeigte FTY720 eine Beeinflussung der Migration und der Positionierung von DC in den Organen. Eine Behandlung mit FTY720 führte in FITC-Skinpainting-Experimenten zu einer 40 bis 60 prozentigen Reduktion der aus der Haut in den Lymphknoten wandernden DC. Weiterhin führte FTY720 Behandlung zu einer Re-Positionierung der 33D1⁺-DC in der Milz. Diese DC wandern nach der Gabe von FTY720 schnell (12h) von ihrer regulären Position, aus den so genannten *bridging-channels*, in die Marginalzone und bilden einen charakteristischen Ring um den Follikel. Im Gegensatz dazu ist die CD205⁺ DC-Population in der Milz nicht von FTY720 beeinflusst. CD205⁺-DC liegen sowohl vor als auch nach der Behandlung in der T-Zellzone. Die Umlagerung der 33D1⁺-DC in die Marginalzone zeigte sich unabhängig von CCR7 jedoch abhängig von den Integrin-Liganden ICAM-1 und MadCAM-1. Der unterschiedliche Effekt von FTY720 auf den zwei DC-Subpopulationen der Milz konnte nicht erschöpfend durch die differentielle Expression von S1P-Rezeptoren erklärt werden. Sowohl 33D1⁺- als auch CD205⁺-DC exprimieren die S1P Rezeptoren S1P_{1,2,4,5}, wobei CD205⁺-DC eine höhere Expression von S1P₁ und S1P₂ zeigten.

Ebenso wie bei *in vitro* generierten DC konnte sowohl bei aus der Haut ausgewanderten als auch in der Milz durch LPS Injektion gereiften DC eine Steigerung der Expression von S1P₁ und S1P₃ nach Reifung gezeigt werden. Die durch LPS vermittelte Reifung führte zu einer von S1P unabhängigen Wanderung der 33D1⁺-DC in den T-Zell-Bereich. Auch die bei FTY720-Vorbehandlung in der Marginalzone gelegenen 33D1⁺-DC wurden komplett in die T-Zellzone rekrutiert. Interessanterweise war die Mobilisation der DC aus der Marginalzone durch LPS nicht abhängig von CCR7 und deutete auf einen bislang unbekanntem CCR7-unabhängigen Schritt der DC Migration hin.

Zusätzlich zu den Effekten von S1P auf DC konnte die Expression des Reifungsmarkers CD83 im murinen Immunsystem untersucht werden. Es zeigte sich, dass CD83 auf reifen DC exprimiert wird, die Expressionshöhe jedoch unabhängig von der Art des Reifungsstimulus ist. Anscheinend wird CD83 sehr schnell auf der Oberfläche der Zellen exprimiert, seine Expression auf der Oberfläche nimmt jedoch mit der Zeit wieder ab, was auf eine Freisetzung von CD83 von der Oberfläche hindeutet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CD83 auf verschiedenen B-Zell-Populationen exprimiert wird und dass seine Expression auf B-Zellen durch TLR-Stimulation angeregt werden kann.

Schlagworte: Dendritische Zellen • Sphingosin-1-Phosphat • Migration

Abstract

In this work, we analysed the influence of sphingosine-1-phosphate (S1P) on dendritic cells (DC). We were able to show that S1P evokes migration on mature but not immature bone-marrow derived DC. DC in an immature state expressed S1P specific receptors S1P_{2,3,4,5} and showed *de novo* expression of S1P₁ and upregulation of S1P₃ after a maturational stimulus. Using specific toxins, it was shown that S1P mediated migration is dependent on G_{o*α*} and the small GTPases Rho and Rac. Treatment of DC *in vitro* with the S1P receptor specific drug FTY720 was sufficient to reduce migration towards S1P but not to CCR7 ligands. The migration observed was furthermore shown to depend on S1P₃.

in vivo treatment with FTY720 was sufficient to alter DC migration and positioning within organs. Under FTY720 treatment the migration of DC from skin to draining lymph nodes in FITC-skinpainting experiments was reduced by 40 to 60%.

Additionally, FTY720 treatment caused a re-positioning of 33D1⁺ DC within the spleen. The DC rapidly (12h) leave their regular position within the bridging channels and equally distribute within the marginal zone, thus forming a characteristic ring around the follicle.

In contrast, CD205⁺ DC are unperturbed and are positioned in the T cell zone of the PALS before and after treatment. The displacement of 33D1⁺ DC showed to be independent of CCR7 but dependent on the integrin-ligands ICAM-1 and MadCAM-1.

The diverse behaviour of the two DC subpopulations within the spleen could not entirely be explained by differential expression of S1P receptor expression. 33D1⁺ as well as CD205⁺ DC express S1P receptors whereas CD205⁺ DC show higher levels of S1P₁ and S1P₂.

For all DC tested, a substantial upregulation of S1P₁ and S1P₃ expression could be found to accompany maturation.

The LPS induced maturation led to a S1P independent migration of 33D1⁺ DC into the splenic T cell zone. FTY720 was not able to suppress this migration. Interestingly, the mobilization out of the marginal zone provoked by LPS was independent of CCR7, pointing to a yet undefined CCR7 independent step in the migration of splenic DC.

Additionally, the expression of the maturation marker for dendritic cells, CD83, was analysed. It could be shown that mature DC express CD83 and that expression levels are independent of the type of maturational stimulus. Obviously, CD83 is rapidly expressed on the cell surface but shows a time-dependent decrease in expression levels, pointing to a shedding of CD83 from the cell surface. Furthermore, CD83 was found to be expressed on different B cell subsets and on B cells activated by TLR ligands.

Keywords: Dendritic cells • Sphingosine-1-Phosphat • Migration

	I
1 ZUSAMMENFASSUNG	III
2 ABSTRACT	V
3 EINLEITUNG	1
3.1 Bedeutung der dendritischen Zelle für das Immunsystem	1
3.2 Dendritische Zellen im unreifen Zustand	1
3.3 Reifung dendritischer Zellen	2
3.4 Expression von Oberflächenproteinen auf DC	3
3.5 <i>In vitro</i> Generierung von DC	4
3.5.1 Antigen-Präsentation, Immunität und Toleranz	5
3.5.2 Wanderung dendritischer Zellen	6
3.6 DC in der Milz	9
3.7 Sphingosin-1-Phosphat: Rezeptoren, Signalwege und Zelleffekte	11
3.7.1 Sphingosin-1-Phosphat, seine extrazellulären Rezeptoren und Analoga	11
4 PUBLIZIERTE UND ZUR PUBLIKATION EINGEREICHTE ERGEBNISSE	17
4.1 Zusammenfassung der Publikationen	17
5 UNPUBLIZIERTE ERGEBNISSE	20
5.1 Die Funktion von S1P auf DC	20
5.1.1 Expression und Regulation von S1P Rezeptoren auf in vitro differenzierten DC	20
5.1.2 S1P ₃ vermittelt die Wanderung von DC auf S1P	21
5.2 CD83 und seine Expression im murinen Immunsystem	22
5.2.1 Charakterisierung CD83-spezifischer monoklonaler Antikörpern	22
5.2.2 Expression von CD83 auf in vitro differenzierten DC	23
5.2.3 Expression von CD83 auf DC in vivo	24
5.2.4 CD83-Expression auf anderen Zellen des Immunsystems	26

	II
6 DISKUSSION	31
6.1 CCR7 steuert die Wanderung dendritischer Zellen	31
6.2 S1P vermittelte Wanderung von DC <i>in vitro</i>	33
6.3 S1P-Einflüsse auf DC <i>in vivo</i>	36
6.3.1 Bedeutung von S1P für die Wanderung aus der Peripherie	36
6.3.2 Positionierung von DC in der Milz	37
6.4 CD83-Expression im murinen Immunsystem	39
7 SCHLUSSFOLGERUNGEN	42
8 ABKÜRZUNGEN	43
9 LITERATUR	44
ANHANG	I
Erklärung über den Beitrag von N. Czeloth zu den Publikationen	i
Publikationen	ii
Publikationsliste N. Czeloth	iii
Erklärung	iv
Danksagung	v
Lebenslauf	vi

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der dendritischen Zelle für das Immunsystem

Dendritische Zellen (DC) stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Sie werden daher häufig auch als 'Wächter des Immunsystems' bezeichnet. DC repräsentieren die wichtigsten Antigen präsentierenden Zellen des Immunsystems und kommen in zwei unterschiedlichen Reifungs-Stadien vor. Im unreifen Zustand sind DC in der Lage, in ihrer Umgebung vorhandenes Antigen (z.B. von Bakterien) aufzunehmen. Diese Antigenaufnahme erfolgt entweder spezifisch über Rezeptoren oder unspezifisch über Pinozytose². Die aufgenommenen Proteine werden im Proteasom degradiert und MHC-Moleküle mit den entstehenden Peptid-Fragmenten beladen.

Nach einem Reifungsprozess können reife DC diese Antigene T-Zellen in Form von Peptid-MHC-Komplexen präsentieren. T-Zellen, die für diese präsentierten Antigene spezifisch sind, werden nun durch die Interaktion mit den DC zur Proliferation, Expansion und Differenzierung angeregt. Auf diese Weise sind die DC maßgeblich an der Entstehung einer adaptiven Immunantwort beteiligt³ und bilden eine Brücke zwischen unspezifischen, angeborenen, und hoch spezifischen, adaptiven Immunantworten.

1.2 Dendritische Zellen im unreifen Zustand

DC besitzen im unreifen Zustand die Fähigkeit, in der Umgebung befindliches Antigen aufzunehmen. Dieser Prozess erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose oder unspezifisch durch Makro- oder Mikropinozytose und führt dazu, dass aufgenommene Proteine in Endosomen degradiert werden^{2, 3}. Die dabei entstehenden Peptid-Fragmente werden auf MHC II-Moleküle geladen und an der Oberfläche der Zellen präsentiert⁴. Im unreifen Zustand erfolgt ein rascher Austausch der auf der Oberfläche befindlichen MHC II-Moleküle, die Halbwertszeit dieser Komplexe beträgt ca. 10min⁵. Die Verweildauer der MHC II-Moleküle auf der Oberfläche von dendritischen Zellen wird molekular über deren Ubiquitinierung gesteuert^{6, 7}.

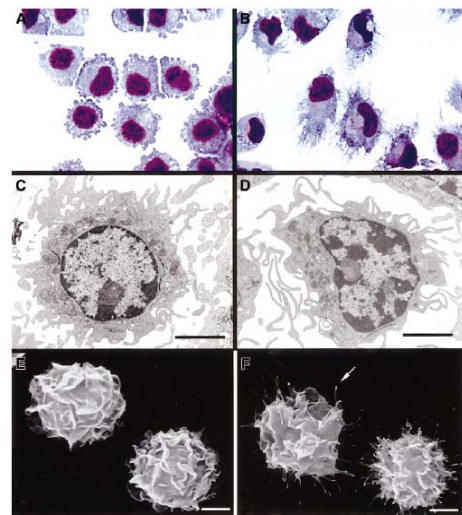


Abbildung 1

Dendritische Zell-Morphologie. Mikroskopische Aufnahmen unreifer (links, A,C,E) und reifer (rechts, B,D,F) dendritischer Zellen. A-B: May-Grünwald-Giemsa Färbung. C-D: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie. E-F: Raster-Elektronen-Mikroskopie. Auffällig sind die feinen membranösen Ausstülpungen der reifen DC. Quelle: Ref.¹.

Unreife DC finden sich an vielen Stellen des Körpers. Alle der äußeren Umwelt direkt angrenzende Organe wie Haut, Lunge, Schleimhäute des Rachenraums, des Darms und der Geschlechtsorgane beherbergen eine große Anzahl dendritischer Zellen, die einen unreifen Phänotyp besitzen. Diese Positionierung der DC ermöglicht eine effiziente Überwachung der Peripherie, um mögliche Pathogene zu erkennen, aufzunehmen und anschließend zu präsentieren.

1.3 Reifung dendritischer Zellen

Durch Entzündungsmediatoren oder Aktivierung bestimmter Signalwege auf unreifen DC kommt es zu einer Ausreifung der Zellen. Sowohl für Pathogene spezifische Moleküle (PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*), als auch von umliegenden Zellen produzierte Zytokine können diese Reifungsstimuli vermitteln. Die Bindung pathogener Muster an *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) führt zu einer direkten Maturation der DC⁸. Ebenso kann das bei einer Inflammation von umliegenden Zellen freigesetzte TNF- α (*tumor necrosis-factor*) über TNF-Rezeptoren (TNFR-I und TNFR-II) auf der Oberfläche der DC zu einer Ausreifung der Zellen führen⁹.

Bei der Reifung dendritischer Zellen verändert sich sowohl ihr Erscheinungsbild, ihre Motilität als auch die Expression von Oberflächenmarkern.

Unreife DC zeigen eine eher abgerundete Morphologie mit kurzen, breiten Ausstülpungen¹. Im Gegensatz dazu besitzen reife DC eine typisch dendritische Morphologie mit relativ langen, feinen Ausstülpungen der Plasma-Membran¹ (siehe Abbildung 1).

Weiterhin sind DC im unreifen Zustand sessil und bewegen sich kaum. Langerhans-Zellen (DC der Epidermis) in der Haut zeigen in diesem Stadium nur Bewegung von Membran-Ausläufern¹⁰. Die Motilität reifer DC dagegen ist stark erhöht. Langerhans-Zellen der Epidermis beginnen nach einem Reifungsstimulus aus der Haut zu migrieren und wandern in drainierende Lymphgefäße und anschließend in die Lymphknoten ein¹⁰. Dort findet man eine ungerichtete Bewegung der DC, während ihre Ausstülpungen eine 'Suchbewegung' (*probing*) in alle Richtungen ausführen und dadurch mit nahe stehenden T-Zellen interagieren. Im lymphatischen Organ angekommen, können nun die DC mit CD4-positiven T-Helfer-Zellen interagieren. Diese Interaktion erfolgt in drei Phasen. Trifft die DC auf eine T-Zelle, die nicht spezifisch für das präsentierte Peptid ist, erfolgt nur eine kurze Interaktion und die Zellen lösen sich voneinander (Phase I). Ist die CD4-T-Zelle jedoch spezifisch für das präsentierte Peptid und erkennt den MHC-II-Peptid-Komplex auf der DC, erfolgt eine längere Phase der Interaktion (Phase II). Dies ermöglicht es der T-Zelle, eine stabile immunologische Synapse

mit der DC zu bilden¹¹. Die T-Zelle wird durch *clustering* (Zusammenballung) des T-Zell-Rezeptor-Komplexes mit kostimulatorischen Molekülen auf der DC (CD80, CD86, CD40) aktiviert. In der dritten Phase steigert die T-Zelle wiederum ihre Motilität, löst sich von der DC und beginnt sich anschließend zu teilen¹².

Durch den Reifungsstimulus wird auf den DC in den ersten 4 Stunden der Vorgang der konstitutiven Antigenaufnahme verstärkt, später jedoch eingestellt und die Halbwertszeit der MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche steigt rapide⁵. Dadurch wird den DC ermöglicht, aufgenommenes und prozessiertes Antigen auch nach vielen Stunden stabil zu präsentieren.

Reife DC finden sich unter normalen Bedingungen fast ausschließlich innerhalb der sekundär lymphatischen Organe (periphere Lymphknoten, Peyersche Platten, mesenterische Lymphknoten), wo sie mit T-Zellen interagieren. Innerhalb der lymphatischen Organe und der Milz finden sich zusätzlich noch DC, die als unreif eingeordnet werden können¹³. Ihre genaue Funktion ist bis jetzt jedoch nicht hinreichend geklärt, sie scheinen jedoch an der Präsentation von zirkulierendem oder drainiertem freien Antigen beteiligt zu sein¹⁴.

1.4 Expression von Oberflächenproteinen auf DC

DC im murinen System sind durch die Expression von CD11c und MHC II gekennzeichnet, diese Marker werden daher zur Analyse dendritischer Zellen herangezogen. Unreife DC exprimieren nur geringe Mengen an kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86, CD83) und intermediäre Mengen an MHC II auf ihrer Oberfläche. Sie sind daher nicht oder nur in geringem Maße dazu in der Lage T-Zellen zu stimulieren. CD40 wird nur wenig, CD86 fast gar nicht und CD80 intermediär auf diesen Zellen exprimiert. Bei der Reifung kommt es

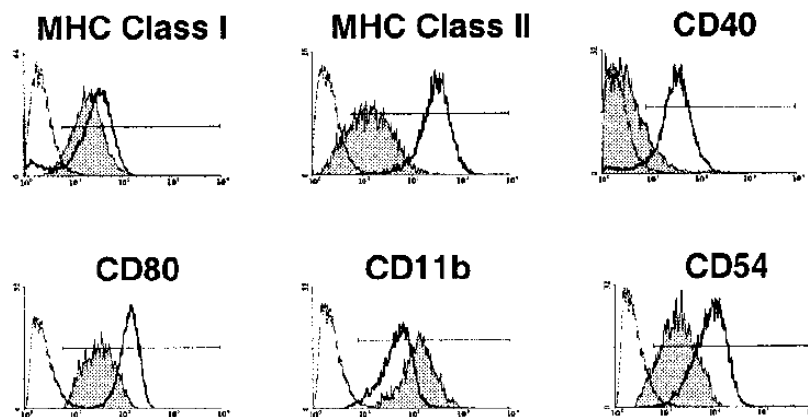


Abbildung 2

Expression charakteristischer DC-Marker auf unreifen (grau hinterlegte Kurve) und reifen (schwarze Kurve) dendritischen Zellen. Gestrichelte Linie: Isotyp-Kontrolle. Quelle: Ref. ¹.

zu einer starken Heraufregulation von CD40, CD86 und CD80, um eine bessere Stimulation von T-Zellen zu ermöglichen. Die während und vor der Reifung aufgenommenen und prozessierten Antigene werden nun verstärkt im Komplex mit MHC II auf der Oberfläche präsentiert und die Menge des auf der Oberfläche exprimierten MHC II steigt stark an¹ (Abbildung 2).

Ein weiteres, wichtiges kostimulatorisches Molekül auf DC ist CD83. Im humanen System wird CD83 häufig als Marker für die Bestimmung des Maturations-Status einer DC benutzt, da es in unreifen DC nicht exprimiert und während der Reifung heraufreguliert wird. CD83 ist ein Sialin-Säure bindendes Ig-verwandtes Lektin (Siglec)¹⁵, welches höchstwahrscheinlich als Dimer vorliegt¹⁶, es scheint sowohl membrangebunden als auch löslich vorzukommen¹⁷, wobei die beiden Varianten unterschiedliche Funktionen ausüben können. CD83 ist maßgeblich an immunmodulatorischen Prozessen beteiligt¹⁸. Mit der exogenen Gabe von löslichem CD83 kann T-Zell-Proliferation unterbunden¹⁹, die Ausbildung von experimentell erzeugter Autoimmun-Encephalitis (EAE, Modellerkrankung für Multiple Sklerose) verhindert²⁰ oder die Immunogenität von Tumoren reduziert und somit das Tumorstadium beschleunigt werden²¹. CD83 scheint demnach am Geschehen der T-Zell-Stimulation grundlegend beteiligt zu sein. Die lösliche Form ist auch bei einigen Leukämien erhöht im Serum vorhanden^{17, 22, 23}. Untersuchungen mit CD83-defizienten Mäusen zeigten, dass dieses Molekül auf Thymus-Epithelzellen bei der Selektion von CD4⁺-T-Zellen im Thymus eine Rolle spielt²⁴, obwohl dort kein Zusammenhang zwischen CD83 auf DC und T-Zell-Proliferation nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde erst kürzlich die Funktion von CD83-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen bei der Ausbildung von zytotoxischen Gedächtnis-T-Zellen beschrieben²⁵. Da bisher kein gut funktionierender Antikörper für CD83 zur Verfügung stand, ist die Bedeutung von CD83 auf murinen DC nur unzureichend untersucht und über seine genaue Funktion nur wenig bekannt. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass transgene Expression von CD83 zu Veränderungen im murinen Immunsystem führen. Eine Bedeutung von CD83 bei B- und T-Zell-Antworten wurde postuliert^{26, 27}.

1.5 *In vitro* Generierung von DC

Für viele Untersuchungen über die Funktion dendritischer Zellen ist eine Aufreinigung dieser Zellen nötig. Die Isolation von DC *in vivo* bereitet aufgrund der geringen Anzahl der Zellen in den Organen und ihrer verzweigten Morphologie jedoch nicht unerhebliche Schwierigkeiten. Es gibt allerdings die Möglichkeit, DC *in vitro* aus Vorläuferzellen zu differenzieren²⁸. Im humanen System werden hierzu Monozyten aus peripherem Blut isoliert und mittels GM-CSF

und IL-4 zu dendritischen Zellen differenziert. Das gleiche ist auch mit Knochenmarkszellen möglich, jedoch wegen der schlechten Zugänglichkeit des Ausgangsmaterials nicht praktikabel. Im murinen System ist es wegen der geringen Blutmenge dagegen äußerst schwierig, DC aus Blut-Monozyten herzustellen. Aus diesem Grund werden Knochenmarkszellen isoliert und hieraus mittels GM-CSF über 7-10 Tage DC differenziert. Die so erhaltenen DC sind zum großen Teil unreif und reifen 24-48h nach Zugabe eines proinflammatorischen Stimulus wie TNF- α oder LPS zu reifen Zellen aus²⁸. Im Gegensatz zum humanen System erhält man nach der Differenzierung der DC ein Gemisch aus phänotypisch reifen, sowie unreifen Zellen. Durch die *in vitro*-Differenzierung ist es möglich aus dem Knochenmark einer Maus bis zu $1 \cdot 10^8$ DC zu gewinnen. Eine Milz enthält im Vergleich ca. $1-3 \cdot 10^6$ DC, die außerdem phänotypisch inhomogen erscheinen.

1.5.1 Antigen-Präsentation, Immunität und Toleranz

Wie oben beschrieben, sind DC in der Lage, in ihrer Umgebung vorhandene Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und die entstehenden Peptide im Kontext von MHC-Molekülen zu präsentieren. Die Präsentation der Peptide kann sowohl über MHC II als auch über MHC I (*cross*-Präsentation) erfolgen²⁹.

Die Präsentation von Peptiden im MHC II-Kontext führt zu einer T-Helferzell-Antwort und dadurch zu einer humoralen Immunität gegen das Antigen. Die Präsentation der Peptide auf MHC I ermöglicht es den DC, eine zytotoxische CD8-T-Zell-Antwort hervorzurufen²⁹.

Im Regelfall werden durch Pinozytose aufgenommene Peptide im Kontext von MHC II präsentiert, wohingegen Peptide von zytosolisch vorliegenden Proteinen (endogene Proteine oder Virusproteine) im Kontext von MHC-I präsentiert werden. Mit Hilfe der Fähigkeit zur *cross*-Präsentation ist es den DC möglich, zytotoxische CD8-T-Zellen durch exogen aufgenommenes Material zu stimulieren. So kann eine adaptive zytotoxische Antwort gegen Viren oder intrazelluläre Bakterien erfolgen, ohne dass die DC selbst von diesen Pathogenen infiziert sein müssen.

Erst kürzlich veröffentlichte Befunde zeigen, dass die Art der Antigenaufnahme die anschließende Prozessierung des Antigens beeinflusst. Während über Pinozytose aufgenommene Proteine im Kontext von MHC II präsentiert werden, so wird über den Mannose-Rezeptor aufgenommenes Antigen in frühe endosomale Kompartimente dirigiert und über MHC I *cross*-präsentiert².

Nicht alle DC-Populationen besitzen die Fähigkeit zur *cross*-Präsentation. In der Milz oder im peripheren Lymphknoten übernehmen nur die $CD8\alpha^+$ -DC^{30, 31} diese Aufgabe. Im

mesenterischen Lymphknoten dagegen sind nur die $CD11b^+CD8\alpha^-$ DC in der Lage *cross*-Präsentation bei der Toleranz-Induktion³² zu übernehmen. In dem die Lunge drainierenden brachialen Lymphknoten finden sich nur sehr wenige DC, die eine Expression von $CD8\alpha$ aufweisen. Hier können jedoch $CD103^+$ DC inhalede Antigenen in der Lunge aufnehmen und die *cross*-Präsentation an $CD8^+$ T-Zellen übernehmen³³.

Im Gegensatz zur Etablierung einer protektiven Immunität sind DC auf der anderen Seite aber auch an der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen beteiligt³⁴⁻³⁷ und ermöglichen das Überleben von reifen T-Zellen in der Peripherie³⁸. DC übernehmen im Thymus eine wichtige Aufgabe bei der Negativ-Selektion von autoreaktiven T-Zellen³⁹. Modellsysteme haben weiterhin gezeigt, dass $TNF-\alpha$ stimulierte, *in vitro*-generierte DC tolerogen auf $CD4^+$ T-Zellen wirken können, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor für Ovalbumin tragen⁴⁰. DC können zudem auch für auf MHC I präsentierte Peptide Toleranz erzeugen. DC, die rekombinante Viruspeptide unter nicht-inflammatorischen Bedingungen exprimieren, führen zu einer Toleranzausbildung gegen dieses Virus⁴¹ und unterbinden eine Antwort von $CD8^+$ T-Zellen. Diese Toleranz wird selbst durch eine Infektion mit dem Virus nicht mehr gebrochen. Erfolgt die initiale Expression der Peptide jedoch unter inflammatorischen Bedingungen, so kommt es zur Ausbildung einer protektiven Immunität⁴¹.

1.5.2 Wanderung dendritischer Zellen

Chemokine und Chemokin-Rezeptoren sind bedeutende Regulatoren der Wanderung von Immunzellen. Sie sind ein wichtiges Steuerelement bei der Wanderung und Positionierung dendritischer Zellen und ihrer Vorläufer innerhalb der Organe. Es handelt sich bei Chemokinen um chemotaktisch wirksame Zytokine. Ihre Funktion besteht darin, Zellen innerhalb der lymphatischen oder nicht lymphatischen Organe zu positionieren (z.B. in der Haut oder in B-/T-Zellzonen) oder aus der Zirkulation in die Organe zu rekrutieren⁴². Die Bindung von Chemokinen an Chemokin-Rezeptoren löst eine chemotaktische Migration von Zellen auf diesen Stimulus hin aus. Charakteristisch für Chemokine sind vier Cysteine, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken die tertiäre Struktur des Chemokins bestimmen. Bis auf wenige Ausnahmen lassen sich Chemokine anhand der Abstände zwischen zwei charakteristischen Cysteinen in CC- und CXC-Chemokine unterscheiden, wobei die Cysteine bei den CXC-Chemokinen durch eine beliebige Aminosäure getrennt sind. Eine Auflistung der bekannten Chemokine, sowie deren bindende Rezeptoren, findet sich in folgender Tabelle.

CC-Chemokine			CXC-Chemokine		
Systematischer Name	Synonyme	Rezeptor	Systematischer Name	Synonyme	Rezeptor
CCL1	TCA-3	CCR8	CXCL1	MIP-2	CXCR2
CCL2	MCP-1	CCR2	CXCL2	MIP-2 α	CXCR2
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	CXCL3	MIP-2 β	CXCR2
CCL4	MIP-1 β ,	CCR5	CXCL4	PF4	
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	CXCL5	ENA-78	CXCR2
CCL6	C10, MRP-1		CXCL6	GCP-2	CXCR1
CCL7	MARC, MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL7		CXCR2
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CCL9/10	MIP-1 γ , MRP-2, CCF18	CCR1	CXCL9	CRG-10, MIG	CXCR3
CCL11	Eotaxin	CCR3	CXCL10	IP-10, CRG-2	CXCR3
CCL12	MCP-5	CCR2	CXCL11	I-TAC	CXCR3
CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL12	PBSF, SDF-1 α	CXCR4
CCL14		CCR1	CXCL13	BLC, BCA-1	CXCR5
CCL15	MIP-5, Mip-1 δ	CCR1, CCR3	CXCL14	Bolekine, BRAK	
CCL16	monotactin-1	CCR1	CXCL15	WECHE, Lungkine	
CCL17	TARC,	CCR4	CXCL16	SRPSOX	CXCR6
CCL18	MIP-4, PARC				
CCL19	MIP-3 β , ELC, Exodus-3, Ck β 11	CCR7			
CCL20	MIP-3 α LARC, Exodus-1, ST38,	CCR6			
CCL21	6Ckine, Exodus-2, SLC, TCA-4	CCR7			
CCL22	MDC, DC/ β -CK, abcd-1	CCR4			
CCL23	MIP-3	CCR1			
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck β 6	CCR3			
CCL25	TECK, Ck β 15	CCR9			
CCL26	Eotaxin-3, MIP-4 α	CCR3			
CCL27	CTACK, ALP, ILC, ESkin, Skinkine	CCR10			
CCL28	MEC	CCR10			

Tabelle 1

Nomenklatur der CC- und CXC-Chemokine und Chemokin-Rezeptoren der Maus. Quelle: Ref. ⁴³.

Vorläufer-Zellen der DC (hauptsächlich Monozyten) wandern aus dem Knochenmark über das Blut in verschiedene Organe ein und entwickeln sich dort zu unreifen DC^{44, 45} (siehe **Abbildung 3**). Unreife und reife DC unterscheiden sich in der Expression von Chemokin-Rezeptoren und migrieren deshalb auf völlig unterschiedliche chemotaktische Stimuli. Unreife DC exprimieren Chemokin-Rezeptoren für so genannte inflammatorische Chemokine, die am Ort einer primären Infektionsreaktion gebildet werden. So tragen unreife Knochenmarks-DC die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 auf ihrer Oberfläche und migrieren *in vitro* auf CCL3, CCL5 oder CCL4⁴⁶. Bei der Reifung wird die Expression dieser Rezeptoren herabreguliert und Chemokin-Rezeptoren für homöostatische Chemokine wie CCR7 und CXCR4 verstärkt exprimiert. Nun wandern die Zellen nicht mehr oder nur noch schwach auf die oben genannten Chemokine, während sie jetzt responsiv für CCL21, CCL19 (beides Liganden für CCR7) und CXCL12 (Ligand für CXCR4) werden⁴⁶. Somit ist sichergestellt, dass zum einen unreife DC zum Ort der Inflammation rekrutiert werden, zum anderen reife DC nach ihrer Aktivierung zum Zweck der Antigen-Präsentation in die drainierenden Lymphknoten gelangen.

CCR7 hat sich als essentiell für die Migration von DC aus der Peripherie erwiesen. Ein Fehlen des Rezeptors führt generell zu einer veränderten Struktur lymphatischer Organe⁴⁷⁻⁵⁰ und einem kompletten Ausbleiben der Migration der DC aus der Haut⁵⁰, dem Darm⁵¹ und der Lunge^{33, 52}.

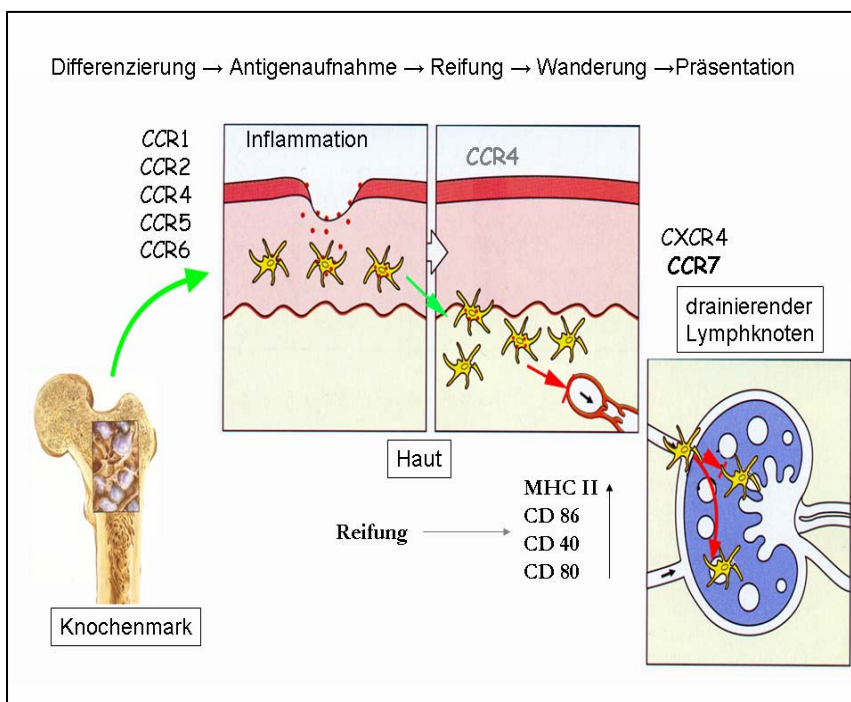


Abbildung 3

Lebenszyklus dendritischer Zellen und beteiligte Chemokin-Rezeptoren am Beispiel der Haut. Vorläufer-Zellen wandern aus dem Knochenmark aus und differenzieren zu unreifen DC in der Haut. Ein inflammatorischer Stimulus führt zu verstärkter Antigenaufnahme vor Ort und anschließender Reifung. Die reifen bzw. reifenden DC wandern CCR7-vermittelt zum drainierenden Lymphknoten und präsentieren dort das aufgenommene Antigen (adaptiert aus: Janeway, Immunobiology, 5th Edition, Garland Publishing).

1.6 DC in der Milz

Zusätzlich zu den Lymphknoten ist die Milz ein weiteres wichtiges sekundär lymphatisches Organ. Mikroanatomisch kann in der Milz zwischen der roten und weißen Pulpa differenziert werden. Die rote Pulpa ist Blut-durchströmt und alternde Erythrozyten werden hier von Makrophagen abgebaut. In der weißen Pulpa, auch PALS (*periarterial lymphoid sheath*) genannt, finden sich hauptsächlich B- und T-Zellen. Der zentrale T-Zell-Bereich wird von einem B-Zell-Follikel umschlossen (siehe Abbildung 4). Umgeben wird die weiße Pulpa von der Marginalzone, in der sich Makrophagen, dendritische Zellen und Marginalzonen-B-Zellen finden.

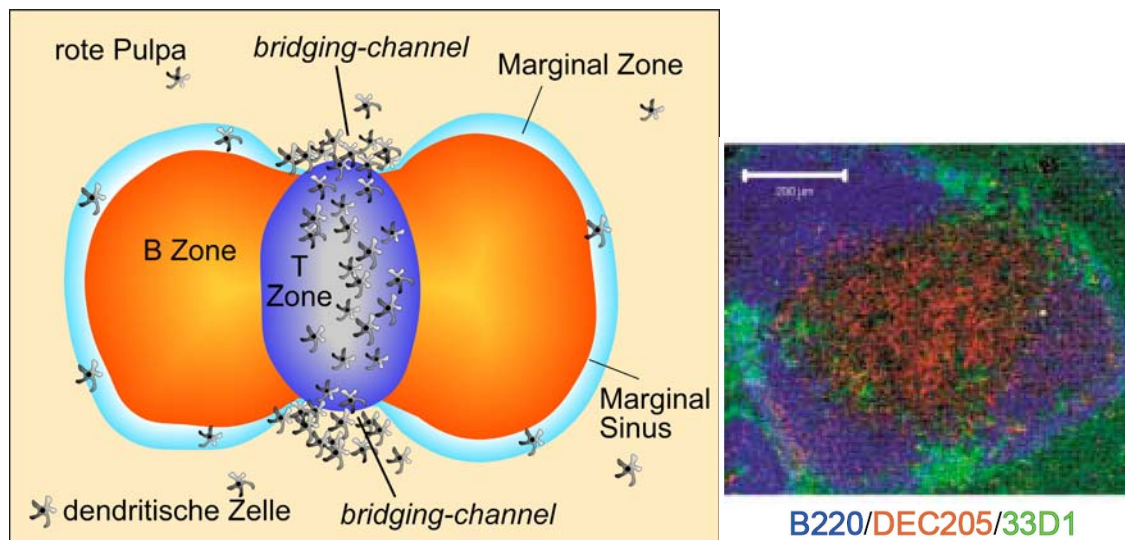


Abbildung 4

Lage der dendritischen Zellen in der Milz. Die jeweilige Anzahl der Zellen deutet die Häufigkeit ihres Vorkommens in einem Gebiet an (links). $33D1^+$ DC sind in den *bridging-channels* lokalisiert, $DEC205^+$ ($CD205$) DC innerhalb der T-Zellzone (rechte Abbildung: aus Ref. ⁵³).

Die DC der Milz haben die wichtige Funktion, Antigen aus dem Blut aufzunehmen, zu prozessieren und schließlich den $CD4^-$ und $CD8^-$ T-Zellen zu präsentieren. Wie bereits erwähnt, präsentieren alle DC über Makro- oder Mikropinozytose aufgenommene Antigene den $CD4^+$ T-Zellen im MHC II-Kontext. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der *cross*-Präsentation, die in der Milz von $CD8\alpha$ -positiven DC übernommen werden. Die Milz enthält mehrere Subpopulationen von DC. Sie lassen sich anhand ihrer $CD11c^-$, MHC II- und $CD8\alpha^-$ bzw. $CD4^-$ Expression unterscheiden. Die am besten charakterisierte DC Population in der Milz ist $CD11c^{high} / MHC II^+$. In einer Milz finden sich ca. $1-3 \cdot 10^6$ DC dieses Typs. Ca. 55% sind $CD4^+ CD8^-$ ($CD4^+$ -DC), 20% $CD4^- CD8^-$ (DN [doppelt neg.]-DC) und 25% $CD4^- CD8^+$ ($CD8^+$ -DC)⁵⁴. Histologisch kann die Positionierung der DC am besten mit den zusätzlichen Markern DEC205 und 33D1 bestimmt werden. Bei DEC205 ($CD205$) und 33D1 ($DCIR2$;

Dendritic Cell Inhibitory Receptor 2) handelt es sich um C-Typ Lektine, die an der Antigenaufnahme und der Prozessierung des Antigens beteiligt sind. Während über 33D1 aufgenommenes Antigen ausschließlich im Komplex mit MHC II präsentiert wird, so wird über DEC205 aufgenommenes Antigen sowohl klassisch auf MHC II als auch auf MHC I *cross*-präsentiert⁵³.

DEC205 wird von CD8⁺-DC exprimiert, die fast ausschließlich in der T-Zellzone zu finden sind. Dendritische Zellen in den *bridging-channels* (Übergang zwischen roter Pulpa und T-Zellzone) sind CD8⁻ und exprimieren 33D1⁵³ (siehe Abbildung 4). Die beiden DC-Populationen unterscheiden sich zusätzlich in der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (siehe Abbildung 5).

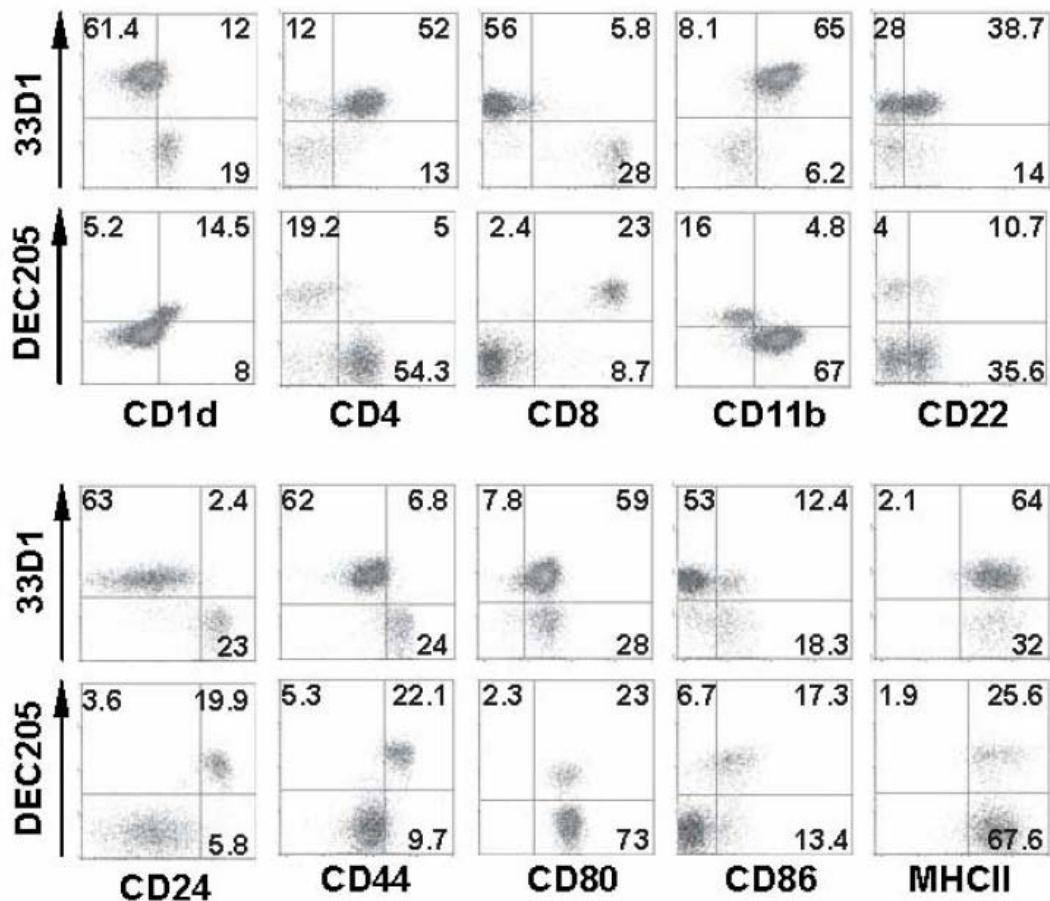


Abbildung 5

Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle auf dendritischen Zellen in der Milz. Die Abbildung zeigt auf CD11c^{high} vorselektionierte Zellen. (Quelle: Ref. ⁵³)

Für die Homöostase der DC in der Milz sind Signale über den Lymphotoxin- β -Rezeptor nötig (LT β R)^{55, 56}. Fehlt der LT β R, so verringert sich die Anzahl der DC in der Marginalzone, in den sog. *bridging-channels* und in der roten Pulpa. Die Anzahl der DC in der T-Zellzone ist

dagegen nicht beeinflusst⁵⁶. Ob DC in der Milz komplett aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark konstituiert werden, oder ob DC-Vorläuferzellen in der Milz proliferieren, ist nicht vollständig geklärt^{54, 56}. Es zeigt sich jedoch ein schneller Austausch der dendritischen Zellpopulationen in der Milz, wobei die Halbwertszeit für den Austausch bei 1,5 (CD8 α^+ -DC) bis 3 Tagen (CD4 $^+$ -DC) liegt^{54, 56}. Parabiosis-Experimente geben Anlass zu der Vermutung, dass sowohl DC-Substitution aus dem Knochenmark über das Blut, als auch aus in der Milz vorhandenen Vorläuferzellen geschieht^{56, 57}.

1.7 Sphingosin-1-Phosphat: Rezeptoren, Signalwege und Zelleffekte

1.7.1 Sphingosin-1-Phosphat, seine extrazellulären Rezeptoren und Analoga

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Lipid, welches hauptsächlich von Erythrozyten⁵⁸ freigesetzt wird und in hohen Konzentrationen im Blut und in der Lymphe vorhanden ist (ca.1 μ M). Sphingosin-1-Phosphat entsteht aus Sphingosin, einem ubiquitär vorhandenen Bestandteil der Plasmamembran, welches von den Sphingosin-Kinasen 1 und 2 phosphoryliert wird. In den immunwissenschaftlichen Fokus geriet S1P durch die Entdeckung, dass das Stoffwechselprodukt ISP-I des Pilzes *Isaria sinclairii* immunsupprimierende Wirkung zeigt⁵⁹. Durch chemische Modifikation dieser Substanz wurde FTY720 entwickelt, welches ebenfalls stark immunsuppressiv wirkt, jedoch weniger Nebenwirkungen als ISP-I besitzt⁶⁰. Bei FTY720 bzw. seiner phosphorylierten

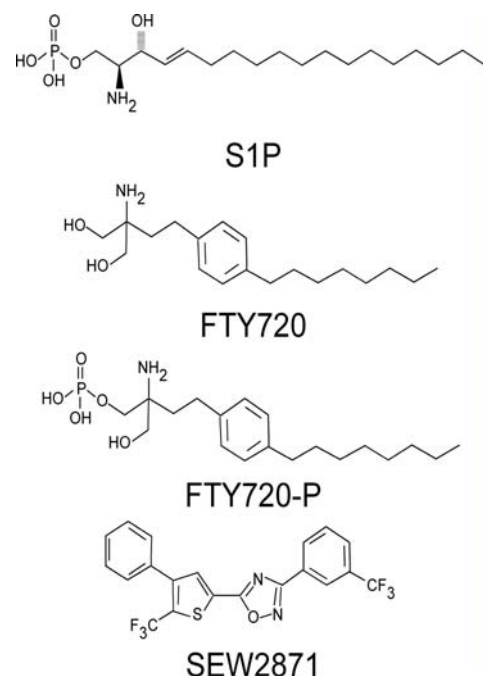


Abbildung 6

Strukturformeln von S1P, FTY720, FTY720-P und SEW2871.

Form (FTY720-P) handelt es sich um ein strukturelles Analogon zu S1P (Abbildung 6). Für die agonistische Funktion muss FTY720 zunächst *in vivo* durch die Sphingosin-Kinase 2 zu FTY720-P phosphoryliert werden⁶¹. Orale Gabe von FTY720 führt zu einem nahezu kompletten Verschwinden der T-Zellen aus dem Blut⁶². Diese Lymphopenie wird dadurch hervorgerufen, dass die Zellen an der Auswanderung aus den sekundären lymphatischen Organen gehindert werden. Die initiale Vermutung, dass die Wirkung von FTY720 auf Induktion von Apoptose in T-Zellen zurückzuführen ist, hat sich nicht bewahrheitet⁶³. Der

Umstand, dass FTY720 bzw. FTY720-P an S1P-Rezeptoren⁶⁴ bindet, war der erste Hinweis darauf, dass S1P ein wichtiger Modulator der Wanderung von Immunzellen ist. S1P kann seine Wirkung sowohl extrazellulär, durch Bindung an S1P-Rezeptoren, als auch intrazellulär vermitteln, wo es wahrscheinlich die Funktion eines *second messenger* übernimmt⁶⁵.

Über die geschilderten Aktivitäten hinaus ist S1P ein wichtiger Botenstoff bei vielfältigen zellulären Prozessen. Seine Funktion reicht von der Regulation der Zellteilung, Apoptose sowie Migration⁶⁶ bis hin zur Blutgefäßbildung⁶⁷, Kontrolle der Herzfrequenz⁶⁸ und Vasodilatation⁶⁹. Seine vielfältigen und weit reichenden Effekte übt S1P hauptsächlich durch Aktivierung unterschiedlicher Signalwege durch die fünf S1P-Rezeptoren, S1P₁₋₅, aus. Jeder Rezeptor aktiviert unterschiedliche Signalkaskaden und führt auf diese Weise zu zum Teil völlig verschiedenen Prozessen in der Zielzelle. Die Komplexität des S1P-Signals wird weiterhin durch die gleichzeitige Aktivierung von verschiedenen Rezeptortypen auf ein und derselben Zelle erhöht.

S1P-Rezeptoren wurden zunächst als Regulatoren der Differenzierung von Endothelzellen identifiziert. Daraus resultierend wurden sie als Edg-Rezeptoren (*endothelial differentiation gene*-Rezeptoren) bezeichnet. Es existieren 8 verschiedene Edg-Rezeptoren, wobei fünf dieser Rezeptoren S1P binden (Edg1,3,5,6,8, zu deren Nomenklatur siehe Tabelle 2) und die restlichen drei Lysophosphatidyl-Säure (LPA; Edg2,4,7). Wegen ihrer Bedeutung für das Immunsystem sollen im Folgenden nur die S1P-Rezeptoren behandelt werden.

S1P bindet an die fünf S1P-Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten und vermittelt ein unterschiedliches, Rezeptor-spezifisches, intrazelluläres Signal. FTY720 bzw. FTY720-P wirkt agonistisch auf S1P-Rezeptoren und vermittelt ähnliche Signale in die Zelle wie S1P. Im Gegensatz zu S1P führt eine Bindung von FTY720-P jedoch zu einer irreversiblen Internalisierung der Rezeptoren und über diese 'super-agonistische' Wirkung zu einer funktionellen Defizienz von S1P₁. Ein kürzlich beschriebener S1P₁ spezifischer Agonist ist SEW2871. Bei dieser Substanz handelt es sich um kein strukturelles Analogon zu S1P. SEW2871 bindet nur teilweise an die S1P-Bindungsstelle und führt ebenfalls wie S1P zu einer Freisetzung intrazellulären Ca²⁺ und in der Folge zur Zellmigration⁷⁰. *In vivo* verursacht SEW2871, genau wie FTY720, eine starke Lymphopenie und hindert Lymphozyten und reife Thymozyten an der Auswanderung aus den Lymphknoten bzw. aus dem Thymus^{68, 70}.

Die Affinitäten von S1P bzw. FTY720, FTY720-P oder SEW2871 zu den verschiedenen Rezeptoren sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

S1P- Rez.	Edg- Nomen- klatur	Affinität zu			
		S1P	FTY720	FTY720-P	SEW2871
S1P₁	<i>Edg1</i>	1,4nM ⁶⁸ ; 6nM ⁷¹ ; 0,4nM ⁷⁰ ; 7nM ⁶⁴	300nM ⁶⁸	0,4nM ⁶⁸ , 0,03nM ⁷⁰ ; 8,2nM ⁶⁴	48nM ⁷¹ ; 14nM ⁷⁰
S1P₂	<i>Edg5</i>	2nM ⁶⁸			
S1P₃	<i>Edg3</i>	2,3nM ⁶⁸ ; 8,7nM ⁶⁴		8,4nM ⁶⁴	
S1P₄	<i>Edg6</i>	75nM ⁶⁸ ; 6,1nM ⁶⁴		7,2nM ⁶⁴	
S1P₅	<i>Edg8</i>	16nM ⁶⁸ ; 7,7 nM ⁶⁴		8,2nM ⁶⁴	

Tabelle 2

Affinitäten von S1P und Analoga zu den fünf S1P-spezifischen Rezeptoren S1P₁-S1P₅.

Alle S1P-Rezeptoren sind Transmembranrezeptoren mit 7 Transmembrandomänen, welche GTP-abhängig ein Signal über heterotrimere G-Proteine in die Zelle vermitteln. Weiter unten in der Signalkaskade kommt es zur Aktivierung der, für Migrationsprozesse sehr wichtigen, GTPasen Rho, Rac und Cdc42^{72, 73} (Abbildung 7). Die Aktivierung von Rac oder Cdc42 führt zu einer Actinpolymerisation, Ausbildung von *membrane-ruffles* (Membran-Ausstülpungen) an der Zelloberfläche und schließlich zur Migration. Die Inaktivierung von Rac und Cdc42 und eine gleichzeitige Aktivierung von Rho verhindert die Polymerisierung von Actin und führt zur Ausbildung von so genannten Stress-Fasern. Die Migration der Zelle wird auf diese Weise unterbunden. Die kleinen GTPasen sind weiterhin an wichtigen intrazellulären Prozessen der dendritischen Zellen, wie Makropinocytose, Endocytose und Präsentation von Antigen beteiligt⁷⁴⁻⁷⁶.

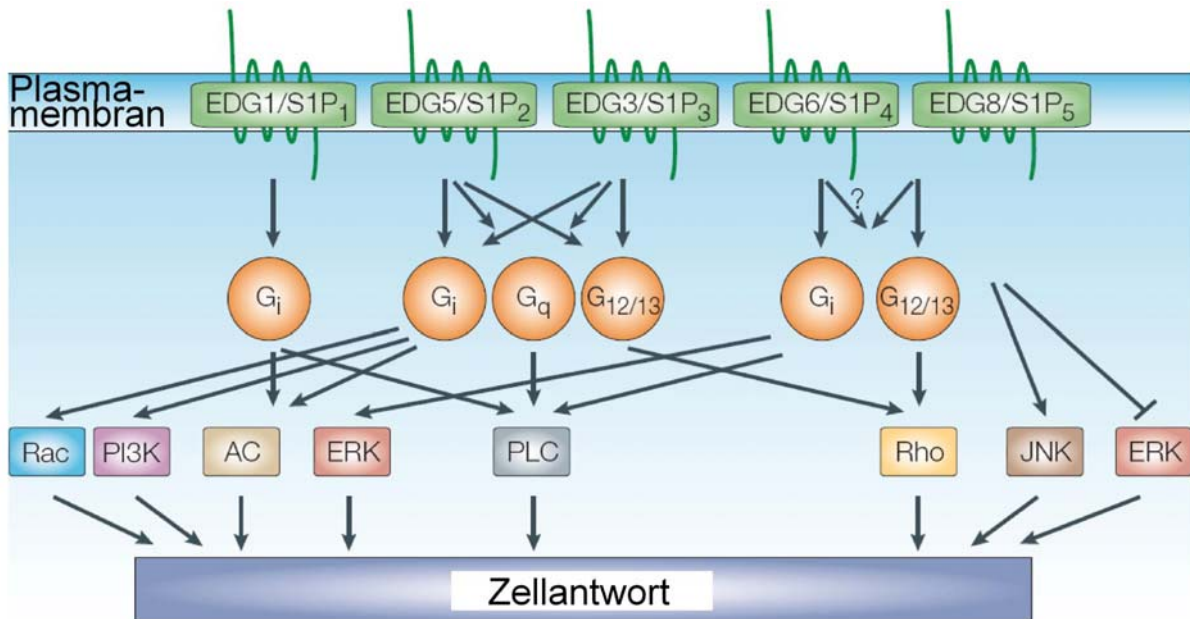


Abbildung 7

Vereinfachte Übersichtsdarstellung über die Signalwege der fünf S1P Rezeptoren. (Quelle: Ref.⁶⁶)

1.7.1.1 S1P₁

Der Rezeptor S1P₁ scheint für die Migration von Immunzellen die größte Bedeutung zu besitzen. Eine Bindung von S1P an S1P₁ führt zu einer Pertussis-Toxin sensitiven Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins G_{αi}. In der nachfolgenden Signalkaskade kommt es zu einer Kopplung mit der GTPase Rac⁶⁷, zu einem Ca²⁺-Flux, Inositol-3-Phosphat Produktion, sowie Actinpolymerisation und Migration. Zusätzlich vermittelt S1P₁ die Aktivierung des ERK-Signalweges und induziert dadurch eine Antwort auf transkriptioneller Ebene.

Ein S1P-Signal über S1P₁ ist absolut notwendig für die Auswanderung von T-Zellen aus dem Thymus und den peripheren lymphatischen Organen⁷⁷. Die Migration von naiven T-Zellen auf S1P *in vitro* (1-10nM) wird durch Bindung von S1P an S1P₁ verursacht. Aktivierte T-Zellen regulieren den Rezeptor jedoch herab und wandern nicht mehr auf S1P⁷⁸. Die Anwesenheit von S1P während der Stimulation von T-Zellen führt zu einer Inhibition der Proliferation⁷⁹. Auch die Lokalisation der Marginalzonen-B-Zellen in der Marginalzone der Milz ist abhängig von S1P₁. Die Migration der Marginalzonen-B-Zellen *in vitro* auf S1P (100nM) wird allerdings durch S1P₃ gesteuert⁸⁰.

Das Fehlen des Rezeptors S1P₁ (S1P₁ genetisch-defiziente Mäuse) ist für den Embryo zwischen E12,5 und E14,5 letal. Während der Embryonalentwicklung findet sich bei E9,5 eine Expression von S1P₁ im Herzen, in der dorsalen Aorta und in den intersomatischen

Arterien und Kapillaren. An E10,5 wird der Rezeptor im Vorderhirn stark und im Rückenmarksstrang schwach exprimiert⁶⁷.

1.7.1.2 *SIP*₂

Im Gegensatz zu *SIP*₁ scheint der Rezeptor *SIP*₂ die Migration von Zellen negativ zu regulieren⁸¹. Eine Liganden-Bindung an *SIP*₂ führt zu einer Kopplung an die heterotrimeren G-Proteine $G_{\alpha i}$, G_q und $G_{12/13}$ ⁸². Anschließend wird genau entgegengesetzt zum Signal durch *SIP*₁ die GTPase Rac inaktiviert und Rho aktiviert. In den Zellkern wird das Signal durch die Aktivierung des ERK-Weges vermittelt. Durch die Aktivierung von Rho kommt es zur Ausbildung von Stress-Fasern in den Zellen, die die Migration verhindern^{82, 83}. Das Signal über *SIP*₂ ist zum großen Teil nicht durch Pertussis-Toxin zu inhibieren und führt zusätzlich Zelltyp-abhängig zu einer Inhibition der Adenylat-Cyclase. Die Wirkungen der Bindung von *SIP* an *SIP*₂ lassen sich durch den spezifischen Inhibitor JTE013 blockieren.

*SIP*₂ defiziente Mäuse zeigen keine auffälligen Änderungen der Erscheinung, Anatomie oder Wundheilung. Im Alter von 3-7 Wochen kommt es bei den Knockout-Mäusen unter neurologischen Tests jedoch zu epilepsieartigen Anfällen und gelegentlich zum Tod. Das Fehlen des Rezeptors führt zu einer Hyper-Erregbarkeit der Pyramidal-Neuronen⁸⁴.

1.7.1.3 *SIP*₃

Die Effekte, die durch *SIP*₃ vermittelt werden, liegen mechanistisch zwischen den deutlich verschiedenen Signalwegen von *SIP*₁ und *SIP*₂. *SIP*₃ vermittelt sein Signal zum großen Teil Pertussis-Toxin sensitiv über $G_{\alpha i}$ ⁸⁵, Teile der Signalkette sind jedoch auch über G_q gekoppelt⁸⁶. Es kommt zu einer Aktivierung von Rac und Rho und zu einer Ausbildung von *membrane-ruffles*. Obwohl auch Rho in diesem Signalweg aktiviert wird, kommt es nicht zur Ausbildung von Stress-Fasern sondern zur Zellmigration^{85, 87}.

*SIP*₃ ist an der *in vitro*-Migration von Marginalzonen-B-Zellen⁸⁰ und Endothelzellen^{73, 87} auf *SIP* beteiligt. Das Fehlen des *SIP*₃-Rezeptors führt *in vivo* zu einem nur schwach ausgeprägten Phänotyp, obwohl es Hinweise gibt, dass *SIP*₃ an der Regulation der Herzfrequenz beteiligt ist⁶⁸. Des Weiteren ist die Lokalisation von Endothelzellen in der Marginalzone in *SIP*₃ defizienten Mäusen verändert⁸⁸. Als spezifischer Inhibitor für *SIP*₃ wurde Suramin beschrieben⁸⁶, allerdings sind weitere Wechselwirkungen mit anderen Proteinen für diese Substanz wenig untersucht.

1.7.1.4 *SIP₄*

Auch *SIP₄* kann nach Bindung seines Liganden *SIP* Zellmigration in einigen Zelltypen hervorrufen⁸⁹, die Expression von *SIP₄* auf T-Zellen dagegen ist nicht für die Wanderung auf *SIP* verantwortlich⁹⁰. Das Signal wird über $G_{\alpha i}$ und $G_{\alpha 12/13}$ vermittelt und führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C⁹¹. *SIP₄* aktiviert die kleinen GTPasen Rac und Cdc42, eine Aktivierung von Rho erfolgt nur schwach und transient⁹¹. Transkriptionell vermittelt dieser Rezeptor ein Signal über die Aktivierung von ERK. Eine agonistische Bindung des Rezeptors scheint für die anti-proliferative Wirkung von *SIP* auf aktivierte T-Zellen wichtig zu sein⁹⁰. Ebenso wie *SIP₁* wird auch die Expression von *SIP₄* nach Stimulation von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor herabreguliert⁹². Ein Phänotyp bei einer Defizienz für *SIP₄* in Mäusen ist nicht bekannt⁸⁴.

1. *SIP₅*

Der Rezeptor *SIP₅* ist der bislang am wenigsten charakterisierte Rezeptor dieser Gruppe. Er wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert⁹³ und spielt eine Rolle bei der Zellmorphologie von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Des Weiteren scheint *SIP₅* die Viabilität von reifen Oligodendrozyten zu steuern⁹³. Die Bildung der Myelinscheiden scheint jedoch durch *SIP₅*-Defizienz nicht verändert zu sein⁹³. Der *SIP₅*-Signalweg wird über $G_{\alpha i}$ und $G_{12/13}$ initialisiert. Es kommt zu einer Aktivierung von Rho und im Gegensatz zu den meisten anderen *SIP*-Rezeptoren zu keinem Ca^{2+} -Flux oder einer Inositol-3-Phosphat-Freisetzung. Auch erfolgt keine Aktivierung von ERK sondern dessen Inaktivierung⁸².

2 Publierte und zur Publikation eingereichte Ergebnisse

Die in dieser Dissertation dargestellten und diskutierten Befunde wurden bereits größtenteils publiziert oder zur Publikation eingereicht. Die Publikationen sind beigefügt. Zitationen, die sich auf diese Artikel beziehen, sind als Fettschrift in eckigen Klammern dargestellt, um sie besser kenntlich zu machen.

1) **N. Czeloth**, G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth and R. Forster. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol.* 2005;175:2960-7.

2) **N. Czeloth**, A. Schippers, W. Müller, B. Eilers, G. Bernhardt and R. Forster. Sphingosine 1-Phosphate Receptor S1P1 regulates Positioning of Dendritic Cells in the Spleen. Manuskript eingereicht, *J Immunol.* 2007.

3) L. Ohl, M. Mohaupt, **N. Czeloth**, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning and R. Forster. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. *Immunity.* 2004;21:279-88.

2.1 Zusammenfassung der Publikationen

In der hier vorliegenden Arbeit sollten die Einflüsse verschiedener Moleküle auf die Wanderung und Funktion dendritischer Zellen untersucht werden. Hierzu wurden Differenzierungsprotokolle für DC aus Knochenmarkszellen, sowie verschiedene Migrations-Assays zur Untersuchung der Wanderung von DC etabliert.

Mit Hilfe von CCR7-defizienten Mäusen wurde zunächst die Bedeutung dieses Chemokin-Rezeptors bei der Wanderung und Funktion der peripheren DC der Haut untersucht [**Ohl et al. 2004**]. Es zeigte sich, dass sowohl in Wildtyp- als auch in CCR7-defizienten Tieren Langerhans-Zellen in gleicher Anzahl in der Haut vorliegen. Nach einem inflammatorischen Stimulus war die Mobilisierung der Langerhans-Zellen aus der Epidermis in die Dermis ebenfalls nicht beeinflusst. Der initiale Schritt der Langerhans-Mobilisation ist anscheinend unabhängig von CCR7. Allerdings konnten CCR7-defiziente Langerhans-Zellen in der Dermis nicht mehr in die lymphatischen Gefäße migrieren. Im Gegensatz zur Mobilisation der Zellen war die Wanderung von sowohl dermalen als auch von epidermalen DC (Langerhans-Zellen) in die Lymphgefäße und die Lymphknoten komplett von CCR7 abhängig. Die gleichen Ergebnisse konnten mit *in vitro* generierten Knochenmarks-DC bestätigt werden.

Das Ausbleiben der Migration der dermalen und epidermalen DC führte dazu, dass in CCR7^{-/-}-Tieren keine DC mit hoher Expression von MHC II in den Haut-drainierenden Lymphknoten vorhanden waren. Diese Zellen stammten aus der Haut und wanderten unter homöostatischen

Bedingungen als so genannte 'semimature' DC in die Lymphknoten ein. Im Unterschied hierzu wanderten DC nach einem inflammatorischen Stimulus als voll maturierte Zellen ein und exprimierten erhöhte Mengen an CD80 und CD86 (vergleiche auch [Czeloth et al. 2005]). Die CCR7-abhängige Wanderung von APC aus der Haut war essentiell für die Entstehung einer proliferativen T-Zell-Antwort nach subkutaner Immunisierung und somit in CCR7^{-/-}-Tieren stark reduziert. Eine systemische Immunisierung mit Antigen konnte jedoch auch in CCR7^{-/-}-Tieren eine robuste T-Zell-Proliferation hervorrufen.

In anschließenden Versuchen wurde die Funktion von S1P auf DC untersucht wobei sich herausstellte, dass reife aber nicht unreife DC *in vitro* auf S1P migrierten [Czeloth et al. 2005]. Die maximale Migration von reifen Zellen wurde bei 500-1000nM S1P beobachtet. Unreife Zellen exprimierten die S1P-Rezeptoren S1P_{2,3,4} und nach der Reifung kam es zu einer *de novo* Synthese von S1P₁ und zu einer Hochregulation von S1P₃.

Mit Hilfe von spezifischen Toxinen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Migration der reifen DC auf S1P über die kleinen GTPasen Rho und Rac vermittelt wird.

Die migratorische Antwort auf S1P konnte durch Vorbehandlung mit FTY720 zwar reduziert, jedoch nicht vollständig unterbunden werden. Es kam zu einer Verschiebung der Responsivitäts-Kurve der DC gegenüber S1P. Die maximale Migration konnte jedoch auch nach FTY720-Behandlung bei höheren S1P-Konzentrationen erreicht werden.

In vivo konnte ebenfalls durch FTY720-Behandlung die Wanderung der DC inhibiert werden. In FITC-*Skinpainting*-Experimenten zeigte sich, dass die Anzahl der in den Lymphknoten wandernden DC nach FTY720-Behandlung um 40-60% reduziert war. Ebenso wie bei *in vitro* maturierten DC fand sich bei unreifen DC in der Haut und reifen DC im drainierenden Lymphknoten eine Hochregulation von S1P₁ und S1P₃.

In weitergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass S1P-Signale die Positionierung der DC in der Milz steuern [Czeloth et al. 2007]. Eine Behandlung von Mäusen mit FTY720 oder SEW2871 führte zu einer Umlagerung von DC aus den *bridging-channels* in die Marginalzone und zu einer charakteristischen ringförmigen Verteilung von DC um die weiße Pulpa herum. Die Positionierung der DC in den *bridging-channels* der Milz war von S1P₁ abhängig und bei Fehlen eines S1P-Signals über diesen Rezeptor verteilten sich die DC gleichmäßig in der Marginalzone. Interessanterweise steuerten S1P-Signale die Positionierung von unreifen 33D1⁺-DC in den *bridging-channels*, jedoch nicht von CD205⁻

DC. Die Positionierung der CD205⁺-DC in der T-Zellzone des PALS war komplett unabhängig von S1P₁.

Die von FTY720 hervorgerufene Umlagerung der 33D1⁺-DC in die Marginalzone war zusätzlich abhängig von den Integrin-Liganden ICAM-1 und MadCAM-1. Obwohl die Umlagerung bei gleichzeitiger Defizienz für ICAM-1 und MadCAM-1 deutlich reduziert war, schienen beide Liganden die Funktion des anderen übernehmen zu können. Eine einfache Defizienz für ICAM-1 oder MadCAM-1 war nicht ausreichend, um die Umlagerung der DC in die Marginalzone zu verhindern.

Durch Immun-Fluoreszenz-Färbungen konnte die Expression für ICAM-1 und MadCAM-1 in der Marginalzone der Milz gezeigt werden. Die korrespondierenden Liganden, Integrin $\alpha_L\beta_2$ (ICAM-1) und Integrin $\alpha_4\beta_7$ oder $\alpha_4\beta_1$ (MadCAM-1) waren auf den dendritischen Zellen der Milz hoch exprimiert.

Während unreife 33D1⁺-DC in den *bridging-channels* der Milz oder nach FTY720-Behandlung in der Marginalzone positioniert waren, wanderten alle DC nach Reifungsinduktion mit einem proinflammatorischen Stimulus (wie z.B. LPS) in die T-Zellzone. Während dieser Reifungs-induzierten Wanderung wurden, ebenso wie bei *in vitro* differenzierten und peripheren DC, die S1P-Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ hochreguliert. Die eigentliche Wanderung der DC in die T-Zellzone zeigte sich jedoch unabhängig von S1P-Signalen und konnte mit FTY720-Behandlung nicht beeinflusst werden. Interessanterweise waren sowohl die Umlagerung der DC in die Marginalzone als auch die LPS-vermittelte Mobilisierung der Zellen in die T-Zell-Bereiche unabhängig von CCR7. Diese Befunde sprechen dafür, dass, ebenso wie bei Langerhans-Zellen, die Mobilisation der DC der Milz unabhängig von CCR7-Signalen verläuft.

Im nachfolgenden sind zusätzlich erhobenen Daten dargestellt, die bis jetzt keinen Eingang in Publikationen gefunden haben. Diese Daten stehen jedoch in einem engen thematischen Zusammenhang und ergänzen die bereits publizierten Ergebnisse. Sie werden hier daher zusätzlich aufgeführt und diskutiert.

3 Unpublizierte Ergebnisse

3.1 Die Funktion von S1P auf DC

3.1.1 Expression und Regulation von S1P Rezeptoren auf *in vitro* differenzierten DC

Die semiquantitative Analyse der S1P Rezeptorexpression auf *in vitro* differenzierten und maturierten DC hatte bereits eine Hochregulation von S1P₁ und S1P₃ während der Reifung gezeigt [Czeloth et al. 2005]. Um einen genaueren Einblick in die Expressionshöhe und den zeitlichen Verlauf dieser Rezeptorexpression zu bekommen, wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer *real time*-PCR bestimmt. Hierzu wurden unreife DC an Tag 7 (CD11c⁺ MHC II^{int}) durchflusszytometrisch sortiert und die RNA präpariert. Reife DC wurden 36-40h später nach Stimulation mit TNF- α /PGE₂ als CD11c⁺MHC II^{high} Zellen sortiert. Die Analyse der mRNA-Expression (gezeigt als relativ zur Expression des *housekeeping* Gens GAPDH) zeigte wie erwartet eine starke Hochregulation von S1P₁ und S1P₃ (S1P₁: 19 fach, S1P₃: 28 fach).

Um weitergehende Informationen über den Verlauf der Expression zu gewinnen, wurden abermals unreife DC (Tag 8) mittels TNF- α /PGE₂ stimuliert und die mRNA Expression über die folgenden 48h analysiert. Abbildung 8 zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression der beiden S1P Rezeptoren S1P₁ und S1P₃. Interessanterweise steigt die Expression von S1P₁ kontinuierlich über 48h an, während S1P₃ schon nach 4h seine maximale Expressionshöhe erreicht, bis 24h nahezu konstant vorliegt und nach 48h fast nicht mehr exprimiert wird.

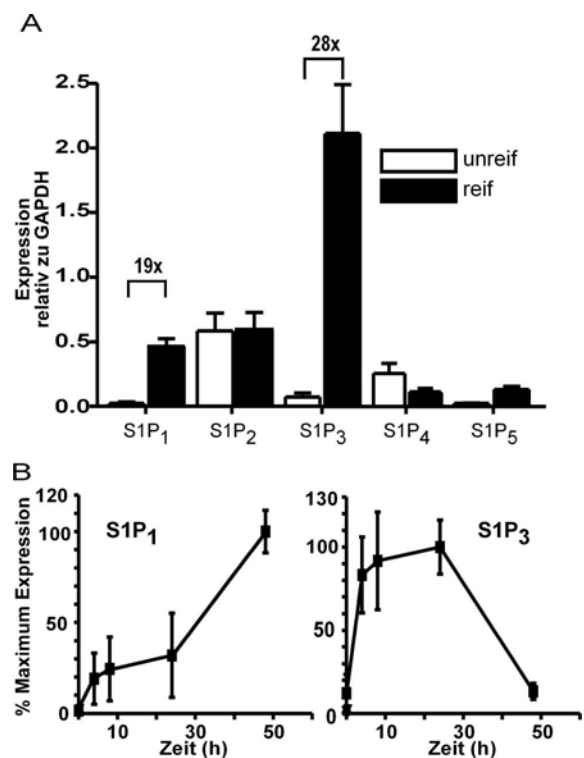


Abbildung 8

Expression von S1P Rezeptoren auf *in vitro* differenzierten DC. A. Unreife DC (CD11c⁺ MHC II^{int}) und reife DC (CD11c⁺ MHC II^{int}, nach 40h Stimulation mit TNF- α /PGE₂) wurden sortiert und RNA präpariert. Die mRNA Expression wurde relativ zu GAPDH bestimmt. B. Zeitlicher Verlauf der Expression von S1P₁ und S1P₃. Unreife DC wurden *in vitro* mittels TNF- α /PGE₂ stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA präpariert und mit Hilfe der quantitativen PCR analysiert. (A: Mittelwerte von 2-3 unabhängigen Experimenten, B: Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten \pm SA.)

3.1.2 S1P₃ vermittelt die Wanderung von DC auf S1P

Bereits die publizierten Ergebnisse mit für kleine GTPasen spezifischen Toxinen [Czeloth et al. 2005, Tabelle 1] deuteten auf die Beteiligung von S1P₃ an der Migration der DC auf S1P hin. Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass das Signal von S1P über die kleinen GTPasen Rho und Rac vermittelt wird. Da S1P₁-Signale jedoch nur über Rac und nicht über Rho gesteuert werden, schien S1P₃ der Rezeptor zu sein, der das für die Migration relevante S1P-Signal in die Zelle vermittelt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden DC aus S1P₃-defizientem Knochenmark differenziert und analysiert. Die S1P₃^{-/-}-DC ließen sich zu normalen DC differenzieren und zeigten auch nach Reifung keine Unterschiede in der Expression von MHC II oder kostimulatorischen Molekülen (Abbildung 9a). S1P₃^{-/-}-DC migrierten jedoch *in vitro* nicht mehr auf S1P (Abbildung 9b) obwohl die Migration dieser Zellen auf einen CCR7 Liganden (CCL21) unbeeinflusst war (nicht dargestellt). Hiermit konnte gezeigt werden, dass S1P₃ die migratorische Wirkung von S1P auf DC vermittelt und ein Fehlen dieses Rezeptors zu einem Verlust der Migrationsfähigkeit auf S1P *in vitro* führt.

Um die Bedeutung von S1P₃ *in vivo* zu untersuchen, wurden DC in den Fußballen von Mäusen injiziert und die Migration der Zellen in den drainerenden poplitealen Lymphknoten gemessen. S1P₃^{-/-}-DC zeigten keinen Defekt gegenüber wt-Zellen, vielmehr wanderten diese Zellen etwas besser als die wt-DC (Abbildung 9c). Anscheinend ist das Vorhandensein von S1P₃ bei diesem Migrations-Geschehen nicht von Bedeutung.

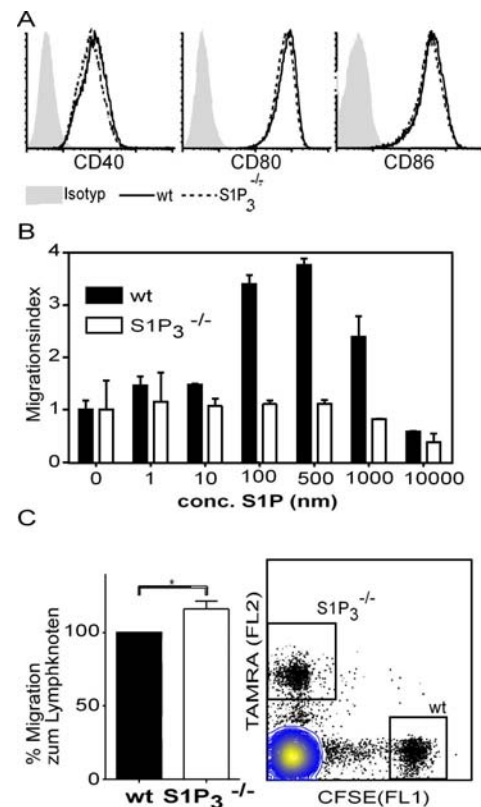


Abbildung 9

Phänotyp und Migration von S1P₃^{-/-} *in vitro* differenzierten DC. A. wt- (durchgezogene Linie) und S1P₃^{-/-}-DC (unterbrochene Linie) wurden mittels GM-CSF differenziert und mit TNF- α /PGE₂ gereift. Die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf CD11c⁺ MHC II^{high} DC ist dargestellt. B. Die Migration von wt- (schwarze Balken) und S1P₃^{-/-}-DC (weiße Balken) auf S1P wurde in einer Boydenkammer untersucht. C. wt- (schwarzer Balken) und S1P₃^{-/-}-DC (weißer Balken) wurden mit TAMRA oder CFSE markiert und in die Fußballen injiziert. Die auf die Anzahl wt-Zellen normierte relative Migration der S1P₃^{-/-}-DC ist dargestellt. (A,B,C: repräsentive Auswahl aus mind. 3 unabhängigen Experimenten.)

3.2 CD83 und seine Expression im murinen Immunsystem

3.2.1 Charakterisierung CD83-spezifischer monoklonaler Antikörper

CD83 ist im humanen System ein etablierter Marker für reife DC. Im murinen System stand bis dato kein gut funktionierender Antikörper für CD83 zur Verfügung. Daher wurden an der GSF in München (Dr. Elisabeth Kremmer) hergestellte monoklonale Antikörper (mAB) gegen murines CD83 im Rahmen dieser Arbeit eingehend charakterisiert. Die gegen ein Fusionsprotein von murinem CD83 und humanem IgG produzierten Antikörper wurden auf reifen und unreifen DC getestet und zwei Antikörperklone gefunden, die auf reifen DC binden (nicht gezeigt). Um die Spezifität dieser mAB zu überprüfen, wurden HEK-Zellen mit einem CD83-Expressions-Plasmid transfiziert und die Bindung der mAB an rekombinant exprimiertes CD83 untersucht. Es zeigte sich, dass die Antikörper für CD83 spezifisch waren, da Kontroll-transfizierte Zellen nicht erkannt wurden (Abbildung 10A). Beide Antikörper waren in der Lage, bis zu 2ng rekombinant hergestelltes CD83-Ig-Fusionprotein im Westernblot zu erkennen (Abbildung 10B), obwohl selbst 500ng Kontrollprotein (murines Nectin 2) kein Signal ergab (nicht dargestellt). Bei den beiden Antikörperklonen handelte es sich um zwei verschiedene Isotypen [IgG2a (3D11), IgG2b (1E6)]. Die vorherige Bindung des einen Antikörpers konnte die Bindung des anderen Antikörpers reduzieren, jedoch nicht vollständig unterdrücken (nicht dargestellt). Anscheinend erkennen beide Antikörper überlappende oder nahe bei einander liegende Epitope.

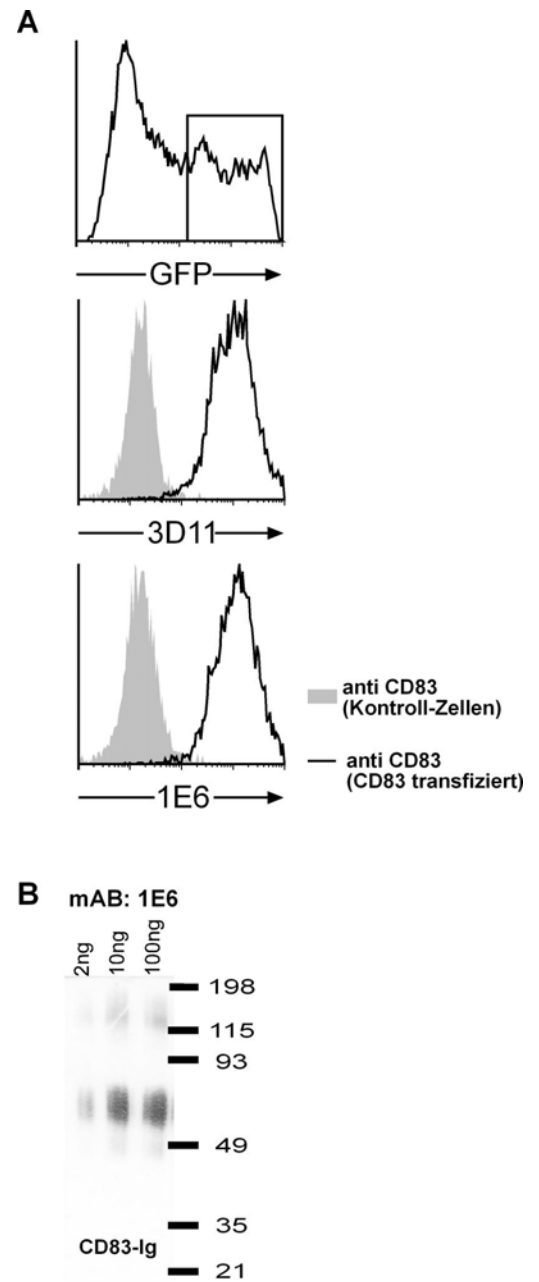


Abbildung 10

Bindung von CD83-Antikörpern an rekombinantes CD83. A. HEK-Zellen wurden transient mit einem GFP-Plasmid und einem CD83-exprimierenden bzw. einem Kontroll-Plasmid kotransfiziert und mit den beiden CD83-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Bindung an GFP hoch exprimierende Zellen ist gezeigt. B. Bindung des CD83 (1E6) an rekombinantes und aufgereinigtes CD83-hIgG₁ im Westernblot. 500ng Kontroll-Protein ergeben keine Bande.

3.2.2 Expression von CD83 auf *in vitro* differenzierten DC

Um die Expression von CD83 auf DC zu untersuchen, wurden *in vitro* differenzierte DC mit Hilfe der Antikörper gefärbt und die Expression im Vergleich zu anderen kostimulatorischen Molekülen untersucht. Es zeigte sich, dass CD83 nur auf reifen, jedoch nicht auf unreifen DC exprimiert wurde. CD83-Expression war bereits auf in der Kultur spontan maturierten DC (MHC II^{high}) vorhanden (Abbildung 11A). Wurden unreife DC von der Platte gespült und mit oder ohne Reifungsstimuli auf neue Platten umgesetzt, so führte das zu einer Ausreifung der meisten Zellen. Reife DC wurden anhand einer hohen Expression von CD11c und MHC II definiert. Die Reifung von DC nach Umsetzen ohne weiteren Stimulus lässt sich höchstwahrscheinlich mit dem Auflösen der bei der Kultur entstehenden *Cluster* (Zusammenballungen) der DC erklären. Die hierbei unterbrochene Bindung der Zellen über E-Cadherine führt schließlich zu einer spontanen Reifung dieser Zellen (unpublizierte Ergebnisse Ira Mellman, präsentiert auf Keystone Symposium, „*Intracellular and Intercellular*

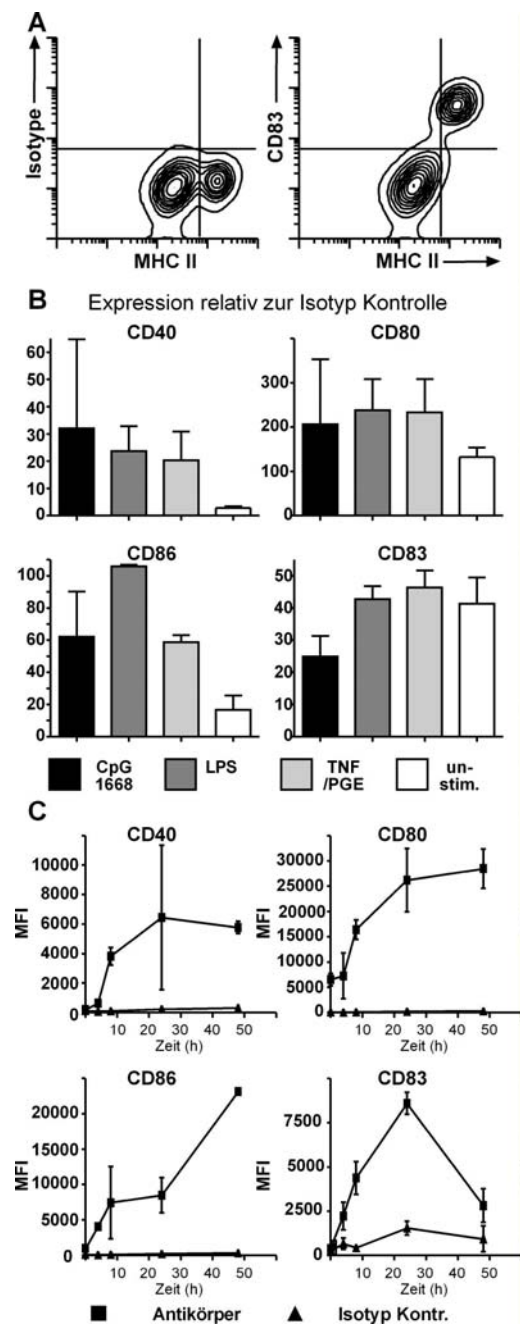


Abbildung 11

Expression von CD83 und anderen kostimulatorischen Molekülen auf *in vitro*-differenzierten DC. A. Unstimulierte, mittels GM-CSF *in vitro* differenzierte DC wurden an Tag 8 mit Antikörpern gegen MHC II, CD11c und CD83 bzw. einer Isotyp-Kontrolle gefärbt. Dargestellt sind CD11c positive DC. MHC II hoch-exprimierende Zellen stellen spontan maturierte DC dar. B. Wie in A differenzierte DC wurden für weitere 24h mit 1µg/ml CpG1668, 1µg/ml LPS, 30ng/ml TNF-α + 1µg/ml PGE₂ stimuliert oder ohne weiteren Stimulus auf neue Platten umgesetzt. Die Expression der kostimulatorischen Zellen auf CD11c⁺ MHC II^{high} DC wurde durchflusszytometrisch gemessen und ist als Vielfaches zur Isotyp-Kontrolle dargestellt. (MFI (Marker) / MFI (Isotyp), Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten) C. Unreife DC an Tag 8 (CD11c⁺ MHC II^{int}) wurden sortiert und mit 1µg/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden an den angegebenen Zeitpunkten mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Antikörper (■) und der entsprechenden Isotyp-Kontrollen (▲) ist dargestellt. (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Exp.)

Signaling in Dendritic Cell Function“, 2007, Colorado, USA). Obwohl auch die spontan maturierten DC eine hohe Expression von MHC II zeigten, unterschieden sie sich deutlich in der Expression kostimulatorischer Marker. CD40 und CD86 waren auf den durch *Cluster*-Auflösung maturierten DC sehr gering exprimiert, werden dagegen nach Stimulation mit z.B. LPS stark hochreguliert (Abbildung 11B). Für CD80 fiel dieser Unterschied nicht mehr so deutlich aus. Dies lässt sich damit erklären, dass bereits unreife DC relativ hohe Mengen an CD80 exprimieren und somit die Unterschiede zwischen unreifen und reifen Zellen nicht so stark ausgeprägt sind.

Unerwarteter Weise wurde die Expression von CD83 schon durch die Spontan-Maturation der DC maximal heraufreguliert. Es fand sich kein Unterschied zwischen DC nach *Cluster*-Auflösung und LPS-stimulierten Zellen in der Expression von CD83. Im Gegensatz dazu schien die Stimulation mit CpG zu einer reduzierten Expression von CD83 zu führen (Abbildung 11B).

Um den zeitlichen Verlauf der Expression der kostimulatorischen Moleküle genauer zu charakterisieren, wurden unreife Zellen an Tag 8 sortiert ($CD11c^+ MHC II^{int}$) und mit LPS stimuliert. Abbildung 11c zeigt den Verlauf der Expression von CD40, CD80, CD86 und CD83 auf diesen Zellen. CD40 und CD80 erreichten die maximale Expression nach 24h und danach blieb die Expression konstant. Die Menge an CD86 auf der Oberfläche stieg über 48h kontinuierlich an. Dagegen erreichte CD83 die maximale Expression nach 24h, nach 48h war die Nachweisbarkeit des Proteins auf der Oberfläche stark verringert.

3.2.3 Expression von CD83 auf DC in vivo

DC im murinen Immunsystem zeigen in den verschiedenen lymphatischen Organen unterschiedliche Reifungs-Zustände. Während in der Milz hauptsächlich unreife DC vorliegen, findet man in den peripheren Lymphknoten sowohl reife ($CD11c^+ MHC II^{high}$) als auch unreife DC ($CD11c^+ MHC II^{int}$)¹³. Zusätzlich existiert eine dritte Population, die zwar CD11c exprimiert, jedoch kein oder nur sehr wenig MHC II. In dieser Population finden sich plasmazytoide DC (pDC)⁹⁴ sowie nicht näher charakterisierte Zellpopulationen, die vielleicht zu den direkten DC-Vorläufern gehören. Verschiedene DC in unterschiedlichen lymphatischen Organen wurden auf die Expression von CD83 untersucht. Hierzu wurden die Organe mittels DNase/Kollagenase verdaut und Zellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c und MHC II gefärbt und die CD83-Expression auf verschiedenen Zellpopulationen ermittelt.

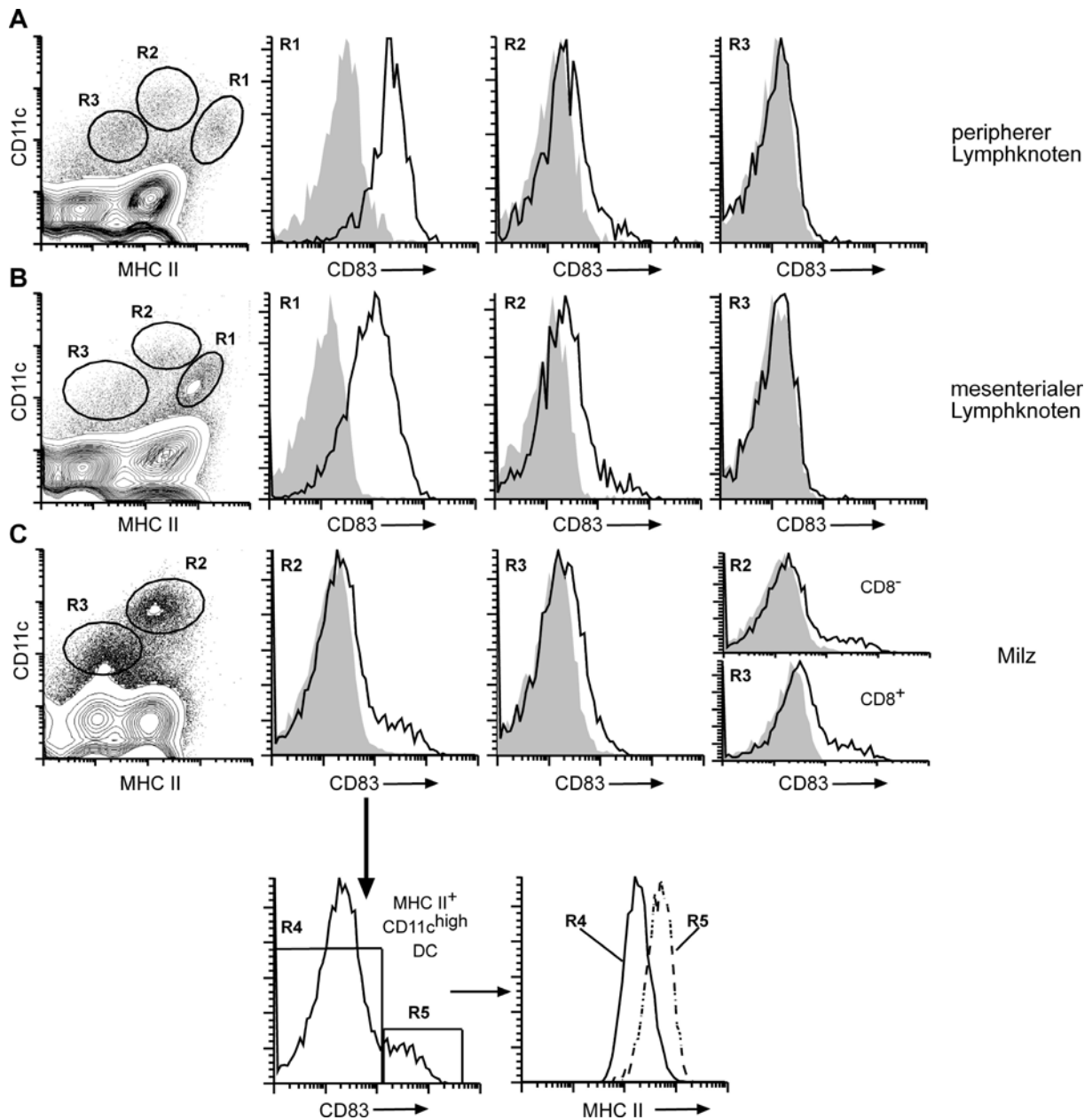


Abbildung 12

Expression von CD83 auf DC *in vivo*. A-C. Expression von CD83 auf den angegebenen DC-Subpopulationen. Anhand der CD11c- und MHC II-Expression wurden verschiedene Regionen (R1-R3) ausgewählt und die Expression von CD83 (schwarze Linie) auf den selektierten Zellpopulationen im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (graue Fläche) dargestellt. In C wurden die DC in Region R2 zusätzlich nach CD8 α -Expression unterschieden. Weiterhin wurden MHC II⁺ CD11c^{high} Zellen anhand der CD83-Expression unterschieden und retrospektiv auf MHC II-Expression analysiert (C untere Zeile). Es zeigt sich, dass CD83⁺-DC höhere Mengen an MHC II exprimieren und somit reifere Zellen darstellen.

Sowohl in den Lymphknoten, als auch in der Milz zeigte sich, dass die CD83-Expression mit der Expression von MHC II auf den DC korreliert. CD11c⁺ MHC II^{low}-Zellen exprimierten kein CD83. Die MHC II^{int}-DC exprimierten kein bis nur wenig CD83 und die MHC^{high}-DC exprimierten deutlich CD83 und repräsentierten somit reife DC (Abbildung 12A,B). In der Milz fanden sich nur sehr wenige Zellen, die CD83 exprimierten (Abbildung 12C). Die CD83⁺-Zellen schienen die wenigen vorhandenen reifen Zellen darzustellen, die auch hier durch eine höhere MHC II Expression gekennzeichnet sind (Abbildung 12D).

3.2.4 CD83-Expression auf anderen Zellen des Immunsystems

3.2.4.1 CD83-negative Zellen

Die Antikörper gegen CD83 boten die Möglichkeit verschiedenste Zellen des murinen Immunsystems auf Expression von CD83 zu analysieren. Es sollte die Frage geklärt werden, ob CD83 ausschließlich auf reifen DC exprimiert wird.

Tabelle 3 stellt zusammengefasst die für CD83 negativ getesteten Zellarten unter zum Teil verschiedenen immunologischen Bedingungen dar.

Zelltyp	Organ	Bedingung
CD4 T-Zellen (CD25 ⁻), CD4 T-Zellen (CD25 ⁺), CD8 T-Zellen	Milz, per LN, mes LN, Thymus, Peyersche Platte, Knochenmark	unbehandelt, 50µg LPS injiziert i.p.
Natürliche Killerzellen	Per LN, mes LN, Milz	unbehandelt, 1µg LPS, 10µg CpG2216, 10µg R848 injiziert s.c.
Plasmazytoide DC	Milz	unbehandelt

Tabelle 3

Für CD83-Oberflächenexpression negativ getestete, wichtige Zelltypen des murinen Immunsystems. Alle Versuche wurden mit unter SPF-Bedingungen gehaltenen Mäusen durchgeführt.

3.2.4.2 CD83-Expression auf B-Zellen

Erste Färbungen von CD83 auf B-Zellen der Milz und der peripheren Lymphknoten hatten gezeigt, dass diese B-Zellen kein bis sehr wenig CD83 auf ihrer Oberfläche tragen. Da B-Zellen zusätzlich zu DC ebenfalls als Antigen-präsentierende Zellen fungieren können⁹⁵, wurden B-Zellen aus verschiedenen Organen genauer auf die Expression von Oberflächen-CD83 untersucht. Es zeigte sich, dass naive B-Zellen aus der Milz so gut wie kein CD83 exprimieren, ebenso fand sich in IgA⁺ Plasma- Zellen in der Lamina Propria des Darms ebenfalls nur eine sehr geringe Expression (Abbildung 13A,B). In den Peyerschen Platten des Darms, sowie im mesenterischen Lymphknoten fanden sich jedoch B-Zellen mit einer deutlichen Expression von CD83. Um zwischen naiven und Keimzentrums-B-Zellen zu unterscheiden, wurden die Expression von CD38 und die Bindung des Pflanzenlektins PNA (*peanut agglutinin*) verwendet. Naive B-Zellen exprimieren hohe Mengen an CD38 und binden kein PNA. Keimzentrums-B-Zellen dagegen exprimieren nur intermediäre Mengen an CD38 und zeigen eine Bindung von PNA⁹⁶.

In den Peyerschen Platten findet man auf den naiven B-Zellen (B220⁺ PNA⁻ CD38^{high}) eine geringfügig höhere Expression von CD83 als auf Keimzentrums-B-Zellen (Abbildung 13C,D). Im mesenterischen Lymphknoten wurde CD83 ebenfalls unterschiedlich von den verschiedenen Subpopulationen exprimiert. (Abbildung 13E, F). Hier verkehrte sich jedoch das Bild und auf Keimzentrums-B-Zellen fand sich eine höhere Expression als auf naiven B-Zellen. Es zeigte sich, dass in einigen Organen sowohl CD83-negative als auch CD83-positive B-Zellen vorliegen.

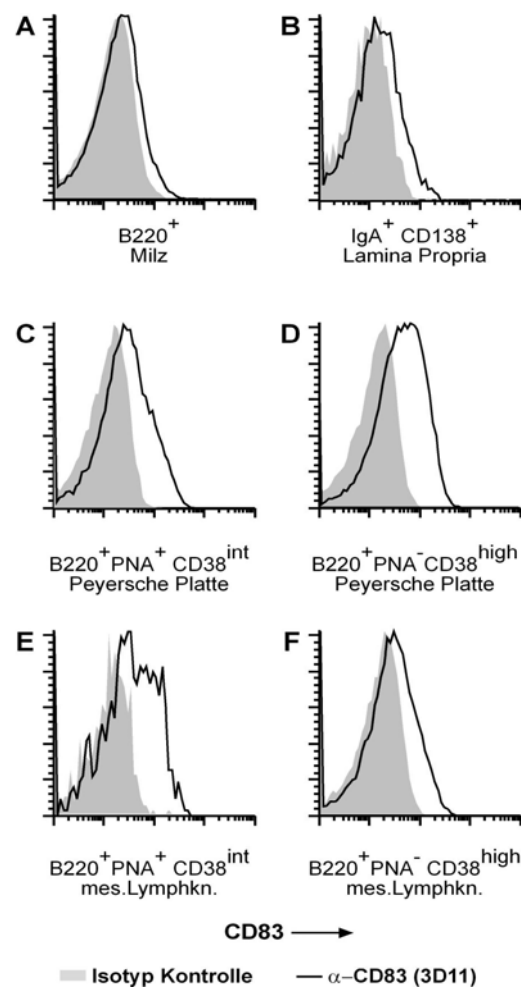


Abbildung 13

CD83-Expression auf B-Zellen. A-F. B-Zellen wurden aus den angegebenen Organen isoliert und anhand der Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle selektiert und auf die Expression von CD83 untersucht. (grau hinterlegt: Isotyp-Kontrolle, schwarze Linie: CD83). A. B-Zellen der Milz. B. Plasma- Zellen aus der Lamina Propria. C. Keimzentrums-B-Zellen aus den Peyerschen Platte. D. Naive B-Zellen aus den Peyerschen Platten. E. Keimzentrums-B-Zellen aus dem mesenterialen Lymphknoten. F. Naive B-Zellen aus dem mesenterialen Lymphknoten (repräsentativ für mind. zwei unabhängige Experiment mit je mind. zwei Tieren).

Vergleicht man die Expressionshöhe von CD83 auf B-Zellen *in vivo* ist diese jedoch deutlich geringer als die von reifen DC.

3.2.4.3 B-Zellen regulieren CD83 nach TLR-Stimulation

Die unterschiedliche Expression von CD83 auf B-Zellen warf die Frage auf, warum B-Zellen in einigen Organen deutlich höhere Mengen an CD83 exprimieren. Um zu untersuchen, ob jede B-Zelle in der Lage ist, CD83 zu exprimieren, wurden naive B-Zellen aus der Milz isoliert und mit Liganden der *Toll-like* Rezeptoren (TLR) oder der TNF-Rezeptoren stimuliert. Wie in Abbildung 13A gezeigt, exprimieren naive B-Zellen aus der Milz so gut wie kein CD83. Diese Zellen wurden mit CFSE markiert, um die Zellproliferation verfolgen zu können, mittels MACS[®]-Aufreinigung isoliert und *in vitro* mit Liganden für verschiedene TLR inkubiert. Die aufgereinigten Zellen wurden mit Poly I:C (TLR 3), LPS (TLR 4), CpG (TLR 9), TNF- α (TNF-Rezeptoren I/II), R848 (TLR 7/8) und Zymosan (TLR 2/6) stimuliert. Es zeigte sich, dass B-Zellen bereits 24h nach Stimulation mit CpG 1668, R848 oder LPS deutliche Mengen an CD83 exprimieren. R848 führte zu der höchsten gemessenen Expression von CD83, gefolgt von CpG1668. In beiden Fällen exprimierten alle B-Zellen CD83. Im Fall der Stimulation mit LPS zeigte sich ebenfalls eine Hochregulation von CD83, jedoch nur auf einem Teil der Zellen. Eine simultane Stimulation von TLR 4 und TLR 7/8 durch LPS und R848 führte zu keiner verstärkten Expression im Vergleich zum Effekt von R848 allein. Auf den mit anderen Liganden stimulierten und unbehandelten Zellen konnte keine Expression von CD83 gezeigt werden (Abbildung 14A).

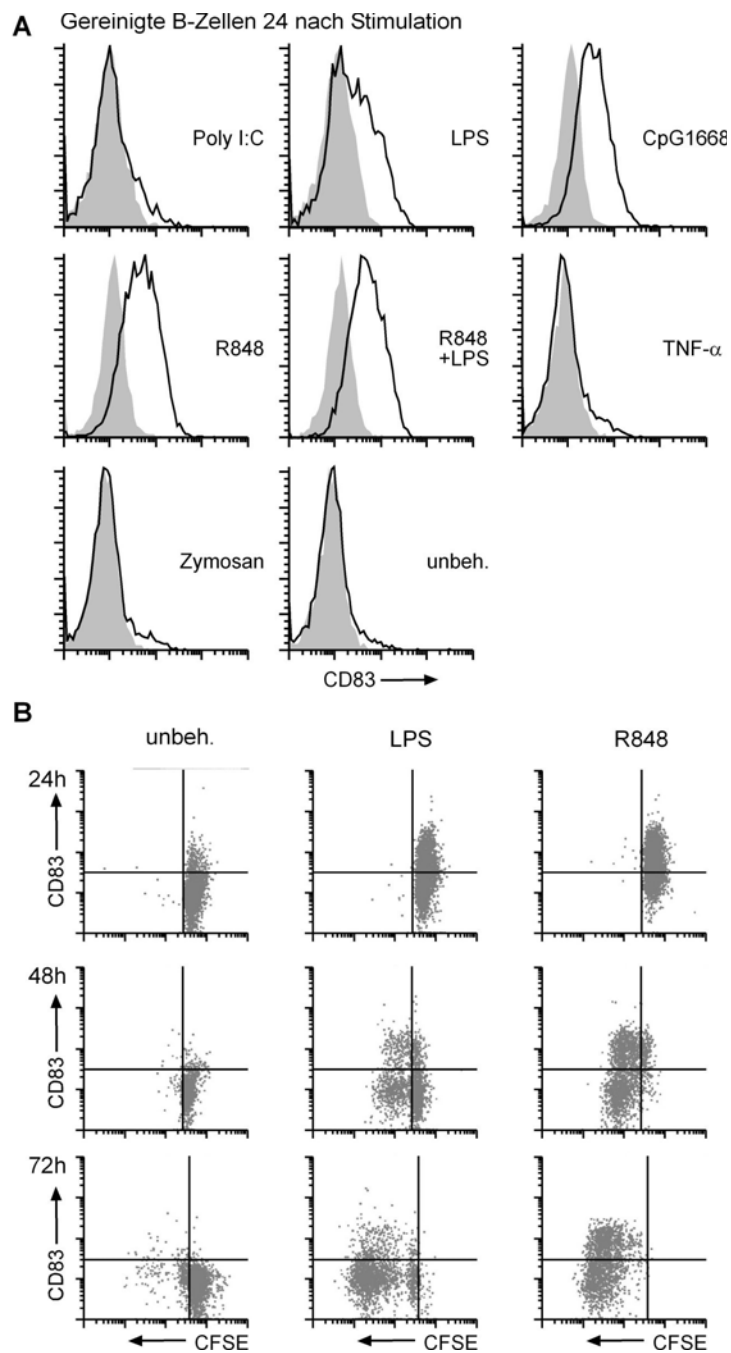


Abbildung 14

CD83 Expression nach B-Zell-Stimulation mit TLR Liganden. A+B. B-Zellen der Milz wurden mit CFSE markiert und mittels MACS®-Negativ-Selektion isoliert und *in vitro* mit 25 μ g/ml Poly I:C, 1 μ g/ml LPS, 1 μ g/ml CpG 1668, 30ng/ml TNF- α , 1 μ g/ml R848, 10 μ g/ml Zymosan oder R848 und LPS gleichzeitig stimuliert. A. 24 h später wurde die Expression von CD83 auf den Zellen bestimmt (grau: Isotyp-Kontrolle, schwarze Linie: CD83 (3D11)). B. Proliferation (CFSE-Verdünnung) und CD83-Expression auf den gereinigten und stimulierten B-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten ist dargestellt.

Zusätzlich zur Expression von CD83 nach 24h wurde der weitere zeitliche Verlauf verfolgt. Hierzu wurden auf den stimulierten Zellen nach 24, 48 und 72h die CD83-Expression und die Zellproliferation analysiert (Abbildung 14B). Der verwendete Fluoreszenz-Farbstoff CFSE ermöglicht es, die Zellteilung der B-Zellen zu beobachten. Während jeder Teilung wird die CFSE-Menge in den Zellen auf die Hälfte verdünnt und das Fluoreszenzsignal dadurch halbiert. Somit weisen Zellen mit einer höheren Teilungsrunde eine niedrigere CFSE-Fluoreszenz auf (Signal nach links verschoben). Bei unstimulierten B-Zellen konnte quasi keine Proliferation und keine CD83 Expression beobachtet werden. LPS dagegen führte auf einem Teil der Zellen zur Expression von CD83, die jedoch mit zunehmender Zellteilung (nach 72h) auf den meisten Zellen wieder verschwand. R848 bewirkte eine Expression von CD83 zunächst auf allen B-Zellen, mit zunehmender Proliferation fand sich auch hier eine Herabregulierung der CD83-Expression auf den Zellen. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass murine B-Zellen aus der Milz die TLR-Rezeptoren 4, 7/8 und 9 exprimieren und eine Stimulation über die entsprechenden Liganden zu einer Aktivierung der Zellen führt. Die Expression von TLR4⁹⁷, TLR7⁹⁸ und TLR9⁹⁹ auf Maus-B-Zellen wurde bereits beschrieben. Im humanen System dagegen exprimieren naive B-Zellen kein TLR4^{100, 101}.

4 Diskussion

4.1 CCR7 steuert die Wanderung dendritischer Zellen

Bei CCR7 handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Chemokin-Rezeptor, der die Chemokine CCL21 (SLC) und CCL19 (ELC) bindet und Chemotaxis und Chemokinese hervorruft¹⁰². CCR7-defiziente Zellen wandern, wie zu erwarten, *in vitro* nicht mehr auf CCL19 oder CCL21. CCR7-defiziente Mäuse zeigen eine stark veränderte Struktur der lymphatischen Organe. In den Lymphknoten finden sich stark verminderte Zahlen von T-Zellen, in der Milz kommt es zu einer deutlich veränderten Struktur der weißen Pulpa. So finden sich in CCR7^{-/-}-Milzen so gut wie keine T-Zellzonen. Die in der Anzahl reduzierten T-Zellen kommen in der roten Pulpa oder in nicht näher charakterisierten Anhäufungen am Rande des B-Zell-Follikels zu liegen⁴⁷. Zusammenfassend belegen diese Daten, dass CCR7 eine äußerst wichtige Rolle bei der Einwanderung und Positionierung von T-Zellen in sekundär lymphatische Organe und somit für T-Zell-abhängige Immunantworten spielt.

Mit Hilfe von sog. FITC-Skinpainting-Experimenten, bei denen DC in der Haut mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und gleichzeitig aktiviert werden, konnte gezeigt werden, dass CCR7 für die initiale Mobilisation der Langerhans-Zellen aus der Epidermis nicht von Bedeutung war [Ohl et al. 2004, Abb.1]. Für die Einwanderung in die lymphatischen Gefäße dagegen und für die Wanderung dieser Zellen zum drainierenden Lymphknoten war CCR7 jedoch essentiell⁴⁷. Die Bedeutung von CCR7 für die DC-Wanderung konnte ebenfalls mit *in vitro*-generierten DC nach Injektion unter die Haut bestätigt werden. Die Migration der injizierten DC in die Lymphknoten erwies sich als komplett CCR7-abhängig. Ein Fehlen von CCR7 auf den DC führte zu einer ca. 98 prozentigen Reduktion der Anzahl der wandernden Zellen [Ohl et al. 2004, Abb.2].

Durch den Verlust der Migrations-Fähigkeit der kutanen DC in CCR7-defizienten Mäusen fehlten hoch MHC II exprimierende DC (CD11c⁺MHC II^{hi}) in den peripheren Lymphknoten nahezu komplett [Ohl et al. 2004, Abb.4]. Diese MHC II^{high}-DC stammen aus der Haut und wandern von dort sowohl unter normaler Homöostase (*semi-mature* DC) als auch unter inflammatorischen Bedingungen (*voll-mature* DC) in den drainierenden Lymphknoten ein. Die Wanderungs-Fähigkeit der DC aus der Haut erwies sich als sehr wichtig für die Etablierung einer adaptiven Immunantwort gegen subkutan injiziertes Antigen. In CCR7^{-/-}-Tieren war die proliferative T-Zell-Antwort gegen subkutan injiziertes Antigen nur bei sehr hohen Antigen-Dosen vorhanden. Die Antwort gegen intravenös injiziertes Antigen war

dagegen nicht von MHC II^{high}-DC abhängig und verlief normal in Abwesenheit von CCR7 [Ohl et al. 2004, Abb. 7].

DC bestimmen den ersten Schritt einer adaptiven Immunantwort³. Durch ihre Fähigkeit, Antigen aufzunehmen und im Kontext von MHC II oder MHC I zu präsentieren, sind sie in der Lage, antigene Muster vom Ort der Infektion zum Ort der Immunreaktion zu transportieren. Diese wichtige Funktion der DC beinhaltet nicht nur die Initialisierung einer adaptiven Antikörper- oder zytotoxischen T-Zell-Antwort sondern auch die Etablierung einer Toleranz gegen Selbstantigene^{29, 31, 32, 40, 103-106}. Ohne die korrekte Funktionsweise der DC ist somit das Gleichgewicht zwischen adaptiver Immunantwort und der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz gestört.

Das Fehlen von CCR7 verändert dieses Gleichgewicht extrem. Das Fehlen der Migration verhindert, dass sowohl Selbstantigene wie auch harmlose Umweltantigene durch DC in die drainierenden Lymphknoten transportiert wird. Weitere Studien deuten darauf hin, dass CCR7-vermittelte Wanderung von DC nicht nur eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Immunantwort sondern auch bei der Regulierung dieser Antwort übernehmen. Es wurde gezeigt, dass in Mäusen, denen die Liganden für CCR7 fehlen, die Immunantwort verspätet einsetzt, danach jedoch stärker abläuft als bei Wildtyp-Tieren¹⁰⁷. Dies wird sehr wahrscheinlich durch veränderte Wanderung regulatorischer T-Zellen¹⁰⁸ oder dermalen/epidermalen DC hervorgerufen.

Langerhans-Zellen der Haut können die dort aufgenommenen Antigene präsentieren und eine Initiierung der Immunantwort gegen stattfindende Infektionen veranlassen. Die Präsentation erfolgt sowohl an CD4- als auch über sog. *cross*-Präsentation an CD8-T-Zellen¹⁰⁹. Auf der anderen Seite sind Langerhans-Zellen jedoch auch für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz¹¹⁰ und für die Regulation von allergischen Reaktionen (Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktion) gegen körperfremde Proteine mit verantwortlich¹¹¹. Die Wanderung von Langerhans-Zellen aus der Haut wird ebenfalls über CCR7 gesteuert. Diese Zellen scheinen zunächst bei der Initiation einer Immunantwort beteiligt, tragen wohl aber auch zu deren Herabregulation bei. Somit bedeutet ein Ausbleiben der Langerhans-Zellwanderung einen Defekt bei Beginn und bei der Regulation einer stattfindenden Immunreaktion auf ein bestimmtes Pathogen oder körpereigene Proteine. Die genaue Klärung der Rolle von Langerhans-Zellen oder der dermalen DC bei der Regulation ablaufender Reaktionen bedarf jedoch weiterer Forschung.

Im Institut geleistete Vorarbeiten hatten gezeigt, dass eine Behandlung mit FTY720 den Einwanderungsdefekt von CCR7^{-/-}-T-Zellen revertieren konnte, so dass auch CCR7-defiziente

T-Zellen vermehrt in die Lymphknoten rekrutiert wurden¹¹². Da zu diesem Zeitpunkt die genaue Funktion von FTY720 und S1P-Rezeptoren nicht bekannt war, lag zunächst die Vermutung nahe, dass FTY720 zu einer Aktivierung eines CCR7-unabhängigen Migrationsweges führt. Es sollte daher untersucht werden, ob die S1P-Rezeptor-spezifische Substanz FTY720 ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Wanderung CCR7-defizienter DC hat. Versuche, die Migration von CCR7-defizienten DC in die drainierenden Lymphknoten durch Gabe von FTY720 zu verbessern führten jedoch zu keinem Ergebnis. FTY720 konnte die Migrationsfähigkeit der DC nicht wieder herstellen (nicht dargestellt). Die bei T-Zellen unter FTY720 beobachtete Wiederherstellung der Migration in den Lymphknoten beruht höchstwahrscheinlich nur zu einem Teil auf einer verbesserten Immigration in den Lymphknoten. FTY720 führt tatsächlich zu einer verstärkten Integrin-abhängigen Adhäsion von T-Lymphozyten auf hochendothelialen Venolen (HEV)¹¹³. Was jedoch schließlich zu einer Akkumulation der T-Zellen im Lymphknoten von CCR7^{-/-} Mäusen führt, ist die Verhinderung der Auswanderung (Egress) der Zellen über die efferenten Lymphbahnen^{77, 114, 115}. FTY720 führt nach Phosphorylierung zu einem agonistischen Signal auf S1P₁ und schließlich zu einer Internalisierung des S1P₁. Auf diese Weise erzeugt die Behandlung mit FTY720 auf T-Zellen einen Phänotyp, der einer S1P₁-Defizienz entspricht. FTY720 besitzt daher trotz initial agonistischer Funktionen auf S1P₁ letztendlich antagonistische Eigenschaften. FTY720 wird daher auch als Superagonist bezeichnet. Damit wäre erklärbar, warum FTY720 keinen positiven Effekt auf die Wanderung CCR7-defizienter DC vermittelt. Um jedoch die Beobachtungen richtig interpretieren zu können, war es essentiell, sowohl den Einfluss von S1P als auch FTY720 auf unreife und reife DC zu untersuchen. Hierzu wurde bestimmt, welche S1P-Rezeptoren von diesen Zellen exprimiert werden und welchen Einfluss S1P auf die Migration der Zellen hat.

4.2 S1P vermittelte Wanderung von DC *in vitro*

Um die Wirkung von S1P auf DC zu untersuchen, wurden *in vitro*-differenzierte DC in verschiedenen Migrations-Assays eingesetzt. Bei Migrationen in einer Boyden-Kammer zeigte sich, dass reife DC auf 500-1000nM S1P migrieren, unreife Zellen zeigten jedoch bei keiner gewählten Konzentration eine Wanderung. Weiterhin konnte keine Wanderung von reifen oder unreifen DC auf FTY720 beobachtet werden [Czeloth et al. 2005, Abb.1]. *in vitro*-differenzierte DC zeigen nach Stimulation mit TNF- α /PGE₂ jedoch keine hundertprozentige Reifung, es finden sich sowohl phänotypisch reife (CCR7⁺) als auch unreife Zellen (CCR7⁻) in der Kultur. In einer Boyden-Kammer konnte allerdings nur

untersucht werden, ob Zellen auf einen bestimmten Stimulus wandern. Die Unterscheidung zwischen verschiedenen Zellen aus einer heterogenen Population ist aus technischen Gründen nicht möglich. Daher wurden die Versuche mit Hilfe von *Transwell*-Migrationen durchgeführt, da hier die Zellen durch eine Membran migrierten und anschließend für eine Analyse gewonnen werden konnten. Versuche mit *Transwell*-Migrationen zeigten eindeutig, dass nur reife Zellen auf S1P wandern, da alle Zellen, die auf S1P gewandert waren, CCR7 exprimierten und einen reifen Phänotyp hatten [Czeloth et al. 2005, Abb.1].

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen im humanen System. Hier wurde gezeigt, dass aus Monozyten differenzierte DC im unreifen, jedoch nicht mehr im reifen Zustand auf S1P migrieren^{116, 117}. Der Grund für diese Unterschiede zwischen dem humanen und murinen System könnte daher rühren, dass die Differenzierung der Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen erfolgt. Während humane Monozyten mittels GM-CSF und IL-4 differenziert werden, findet die Differenzierung der Mauszellen nur mit Hilfe von GM-CSF statt. Eigene Versuche haben jedoch gezeigt, dass auch murine Knochenmarks DC, die mit GM-CSF und IL-4 differenziert wurden, im reifen Zustand auf S1P migrierten (nicht dargestellt). Ein weiterer Unterschied zwischen humanen und murinen Zellen ist deren Ausgangsmaterial. Anscheinend ergeben sich deutlich verschiedene dendritische Zelltypen, wenn deren Differenzierung aus Monozyten oder Knochenmarkszellen erfolgt. Letztendlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die geschilderten Unterschiede spezifisch für die betrachteten Spezies sind.

Um die Wanderung von DC auf S1P *in vitro* eingehender zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren für kleine G-Proteine und GTPasen verwendet¹¹⁸⁻¹²². Viele, die Migration induzierende Substanzen aktivieren über ihren entsprechenden Rezeptor zunächst die kleinen G-Proteine und vermitteln somit ein extrazelluläres Signal in die Zelle. Zusätzlich werden Transkriptionsfaktoren aktiviert und es kommt auch zu einer Veränderung der zytoskelettalen Proteine (z.B. Actin, Tubulin). Eine grobe Unterscheidung bei Migrationsprozessen kann durch die Anordnung der Actin-Moleküle innerhalb der Zelle getroffen werden. Signalwege über die kleine GTPase Rho führen meist zu so genannten Stress-Fasern, die die Migration verhindern. Rac vermittelte Signale unterstützen den Migrationsprozess der Zellen und es kommt zur Ausbildung sog. *membrane-ruffles*, wo das Actin hauptsächlich an der Zellmembran polymerisiert vorliegt^{72, 73, 85, 123}.

Eine Blockierung von $G\alpha_i$ über Pertussis-Toxin führte zu einem vollständigen Erliegen der Migration auf S1P. Ebenso führte eine Blockierung der Signalwege über die kleinen GTPasen Rac (Letales Toxin) und Rho (C3 Toxin) zu einer nahezu kompletten Inhibition der

Migration auf S1P [Czeloth et al. 2005, Tab. 1]. Das S1P-Signal, welches in DC die Migration hervorruft, lief somit über $G\alpha_i$ und die kleinen GTPasen Rho und Rac. Dieser Signalweg sprach für eine Bedeutung von S1P₃ bei diesem Prozess.

Um die S1P-Rezeptor-Expression zu untersuchen, wurden *in vitro*-differenzierte DC sowohl unreif (CD11c⁺MHC II^{int}) als auch nach Reifung mittels TNF- α /PGE₂ (CD11c⁺MHC II^{hi}) durchflusszytometrisch sortiert und anschließend RNA präpariert. Mittels semiquantitativer PCR konnte gezeigt werden, dass unreife DC die S1P Rezeptoren 2, 3 und 4 (S1P_{2,3,4}) exprimierten. Nach der Maturierung exprimierten die reifen DC zusätzlich S1P₁ und hatten S1P₃ stark heraufreguliert [Czeloth et al. 2005, Abb. 4]. Die anfänglichen Befunde mit der semiquantitativen PCR konnten durch quantitative *real time*-PCR bestätigt werden. Es zeigte sich, dass S1P₁ und S1P₃, ausgehend von sehr geringen Expressionshöhen in den unreifen Zellen, durch Reifung deutlich heraufreguliert wurden. S1P₃ zeigte zusätzlich deutlich höhere Expression als S1P₁; S1P₃ war der am stärksten exprimierte S1P-Rezeptor in den reifen DC [Czeloth et al. 2005 Abb. 4 und Abbildung 8]. Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich bei Zellen aus der Haut, die dort im unreifen Zustand vorhanden sind und nach Aktivierung in den drainierenden Lymphknoten wandern, um dort als reife Zellen anzukommen. Der Vergleich der unreifen DC in der Haut und der reifen Zellen im Lymphknoten zeigte eine starke Hochregulation von S1P₁ und eine moderate Hochregulation von S1P₃ [Czeloth et al. 2005, Abb.5]. Bei Zellen in der Milz konnte ebenfalls eine starke Hochregulation von S1P₁ durch einen Reifungsstimulus (LPS) gezeigt werden. S1P₃ wurde zwar ebenfalls erhöht exprimiert, erreichte jedoch nur eine geringe Expressionshöhe.

Diese Beobachtungen deuteten auf eine Rolle von S1P₁ oder S1P₃ für die Migration von DC auf S1P hin. Um die Rolle der S1P-Rezeptoren genauer zu untersuchen wurde die S1P-Rezeptor spezifische Substanz FTY720 verwendet. FTY720 war selbst nicht in der Lage bei DC eine migratorische Antwort hervorzurufen. Eine Vorbehandlung von Zelllinien führt jedoch zu einer Internalisierung von S1P-Rezeptoren und zu einer Inhibition der S1P-vermittelten Signale¹²⁴. Daher wurden reife DC ebenfalls mit FTY720 vorbehandelt und die Wanderung der Zellen auf S1P und einen CCR7-Liganden untersucht. Eine Vorbehandlung der Zellen mit FTY720 führte zu keiner Reduktion der Migration auf den CCR7-Liganden CCL21, im Gegenteil konnte eine leicht erhöhte Migration festgestellt werden. Die Migration von DC auf S1P konnte hingegen dosisabhängig mit FTY720 reduziert werden. Eine Vorbehandlung mit FTY720 führte zu einer Verschiebung der Responsivität der Zellen zu höheren Konzentrationen von S1P. Die maximale Migration konnte somit immer noch bei höherer Konzentration des Stimulus erreicht werden [Czeloth et al. 2005, Abb. 2]. Da

FTY720 zu einer Internalisierung von S1P₁, S1P₂ und S1P₅ jedoch nicht S1P₃ führt¹²⁴, wiesen diese Ergebnisse auf eine maßgebliche Rolle von S1P₃ bei der Migration hin. Zusätzlich hatten die Toxin-Experimente gezeigt, dass die die Migration auslösenden Signale abhängig von G_{oi}, Rac und Rho vermittelt werden. Auch dies sprach für eine Beteiligung von S1P₃ an diesem Prozess, denn im Gegensatz zu S1P₁ verläuft der Signalweg bei S1P₃ nicht nur über Rac, sondern zusätzlich über die kleine GTPase Rho. Mit S1P₃-defizienten Zellen konnte schließlich bewiesen werden, dass die Migration der DC tatsächlich über diesen Rezeptor gesteuert wird. S1P₃-defiziente DC wanderten *in vitro* nicht mehr auf S1P obwohl die Zellen einen normalen Phänotyp besaßen und unverändert auf CCR7-Liganden migrierten (**Abbildung 9B**). *in vivo* wanderten S1P₃-defiziente DC nach Injektion in den Fußballen völlig unbeeinträchtigt in den drainierenden Lymphknoten. Im Vergleich zu wt-Zellen zeigten sie sogar eine etwas verbesserte Migration (**Abbildung 9c**). Diese Befunde entsprachen in etwa denen, die mit Marginalzonen-B-Zellen gemacht wurden. Die Wanderung von Marginalzonen-B-Zellen auf S1P *in vitro* ist abhängig von S1P₃, die Positionierung dieser Zellen in der Marginalzone jedoch von S1P₁⁸⁰. Diese Ergebnisse sprechen deutlich dafür, dass die Migration auf S1P nicht unbedingt die Effekte von S1P *in vivo* widerspiegelt. Anscheinend gibt es *in vivo* andere Mechanismen von S1P, die nicht mit den Standard-Migrationsassays erfasst werden können.

4.3 S1P-Einflüsse auf DC *in vivo*

4.3.1 Bedeutung von S1P für die Wanderung aus der Peripherie

Die Regulation der S1P-Rezeptoren auf *in vitro* generierten DC und während der Reifung und Wanderung *in vivo* wiesen auf eine wichtige Funktion dieser Rezeptoren bei diesen Prozessen hin. Um den Einfluss der Rezeptoren während der Migration der DC aus der Haut in den drainierenden Lymphknoten zu untersuchen, wurden Mäuse mit FTY720 oral behandelt und FITC-Skinpainting-Experimente durchgeführt. Eine Behandlung der Mäuse mit FTY720 führte zu einer Reduktion der Anzahl der Zellen, die in den Lymphknoten einwandern. 24h nach Aktivierung der DC war die Zahl der migrierten Zellen um 40% und nach 48h um 60% reduziert [Czeloth et al. 2005, Abb. 3]. Die Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86) auf den eingewanderten Zellen war dagegen nicht beeinflusst. Dieser Befund bestärkte die Vermutung, dass S1P-Rezeptoren für die Wanderung von DC aus der Haut eine große Rolle spielen. Da FTY720 die Wanderung auf CCR7-Liganden nicht beeinflusst, ist es wahrscheinlich, dass S1P-Rezeptoren den ersten Schritt der DC-Migration,

die Mobilisierung der Zellen aus der Haut, steuern. Man könnte vermuten, dass S1P₁ auf den DC eine ähnliche Rolle wie auf T-Zellen spielt. Für T-Zellen ist S1P₁ nötig, um die endotheliale Barriere zu den lymphatischen Gefäßen zu überwinden und so ein Auswandern aus dem Lymphknoten zu ermöglichen^{78, 114, 115, 125}. Zusätzlich könnten auch S1P-Signale auf den Endothelzellen selbst die Migration der DC beeinflussen^{125, 126}.

Diese Ergebnisse wurden durch neue Veröffentlichungen ergänzt, in denen gezeigt wurde, dass S1P und seine Rezeptoren maßgeblich die Wanderung von DC aus der Lunge in den mediastinalen Lymphknoten regulieren¹²⁷. Eine lokale Applikation von S1P oder FTY720 konnte die Wanderung von DC aus der Lunge verhindern und die Ausbildung von experimentell ausgelöstem Asthma unterbinden¹²⁷. Weiterhin führte diese Behandlung zu einem veränderten Zytokin-Milieu im drainierenden Lymphknoten und einer veränderten Immunantwort¹²⁷. Ähnliche Befunde wurden auch bei DC *in vitro* gemacht^{116, 128, 129}.

Die Veränderung der Effektor-Antwort in FTY720- oder S1P-behandelten Tieren wurde mit einer reduzierten Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen DC und T-Zellen erklärt¹²⁷. Die während dieser Arbeit erzielten Resultate sprechen jedoch eher für eine direkte Funktion der S1P-Rezeptoren während der Migration bzw. der Mobilisation der Zellen. Während FTY720-Behandlung die Migration auf CCR7-bindende Chemokine nicht beeinflusst, wird das Signal über S1P unterbunden oder stark reduziert. Dies spricht für eine kooperative Rolle von S1P-Rezeptoren und Chemokin-Rezeptoren bei der Mobilisation der DC aus dem Gewebe.

4.3.2 Positionierung von DC in der Milz

In der Milz finden sich zwei funktionell deutlich unterschiedliche Populationen von DC. CD8⁺-DC sind zur Aufnahme von apoptotischem Material und zur *cross*-Präsentation fähig, CD8⁻-DC dagegen präsentieren aufgenommene Antigene im Kontext von MHC II (siehe Einleitung). Auch die Lokalisation der beiden Zelltypen ist deutlich verschieden. CD8⁻ CD4⁺33D1⁺-DC in der Milz sind unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in den *bridging-channels* lokalisiert. Sie befinden sich im Übergangsbereich von der T-Zellzone zur Marginalzone und der roten Pulpa⁵³. CD8⁺CD4⁻CD205⁺-DC liegen jedoch direkt und ausschließlich innerhalb der T-Zellzone. Es konnte gezeigt werden, dass die 33D1⁺-DC über ein durch ein S1P₁ vermitteltes Signal in den *bridging-channels* positioniert werden. Ein Wegfallen dieses Signals durch Gabe von FTY720 oder SEW2871 führte zu einer Mobilisation dieser Zellen, die sich schließlich gleichmäßig in der Marginalzone verteilten und so den Follikel umspannten [Czeloth et al. 2007, Abb. 1 und 3]. CD205⁺-DC dagegen

waren von diesen S1P-Rezeptor spezifischen Substanzen nicht beeinflusst und änderten ihre Position innerhalb der Milz nicht [Czeloth et al. 2007, Abb. 4]. Die Mobilisation in die Marginalzone war abhängig von den Integrin-Liganden ICAM-1 und MadCAM-1, wobei eine einfache Defizienz eines Integrin-Liganden durch den anderen kompensiert werden konnte [Czeloth et al. 2007, Abb. 5 und 6]. Da die Inhibition der Umverteilung der DC nicht vollständig war, lässt sich vermuten, dass dies mit der starken Redundanz im Integrin-/Liganden-System zusammenhängt und dass verwandte Integrine zusammen mit ihren Interaktionspartnern die fehlende Interaktion zumindest teilweise wieder herstellen. Für Marginalzonen-B-Zellen wurde ebenfalls beschrieben, dass ihre Positionierung innerhalb der Marginalzone von S1P₁⁸⁰ und den Integrin-Liganden ICAM-1 und VCAM-1 bestimmt wird¹³⁰. Auch in diesem Fall kann ein Fehlen des einen Integrin-Liganden durch den anderen kompensiert werden.

Die Umlagerung der 33D1⁺-DC war abhängig vom Reifungszustand der Zellen. Die unter normalen Bedingungen in der Milz vorhandenen DC besitzen einen unreifen Phänotyp¹³. Die durch FTY720 vermittelte Umlagerung trat jedoch nur bei unreifen Zellen auf und konnte durch Gabe eines Reifungsstimulus (LPS) unterbrochen werden. Nach LPS-Behandlung wanderten DC aus FTY720-behandelten und unbehandelten Tieren gleichermaßen in die T-Zellzone ein. Nach Gabe von LPS fanden sich daher keine DC mehr in der roten Pulpa oder in der Marginalzone [Czeloth et al. 2007, Abb. 2]. Diese Wanderung wurde anscheinend durch Veränderung der Chemokin-Rezeptor-Expression, der Integrin-Adhäsivität und der grundsätzlichen Wanderungsfähigkeit der Zellen gesteuert. Interessanterweise war sowohl die Verlagerung der 33D1⁺-DC in die Marginalzone, als auch die durch LPS vermittelte Emigration aus dieser, von CCR7 unabhängig. In unbehandelten CCR7^{-/-}-Tieren lagen die DC hauptsächlich in der roten Pulpa und in nicht näher zu definierenden Strukturen an und im B-Zell-Follikel. Nach Behandlung mit FTY720 war eine sehr ähnliche Verteilung der DC wie in Wildtyp-Tieren zu beobachten. Nach FTY720-Behandlung relokalisieren die DC auch hier in die Marginalzone um den B-Zell-Follikel.

Die durch FTY720 hervorgerufene Verteilung der DC in der Marginalzone war auch hier durch LPS dominiert. Die DC wanderten aus der Marginalzone aus und assoziierten lose mit den residualen T-Zell-Bereichen [Czeloth et al. 2007, Abb. 7]. Obwohl allgemein angenommen wird, dass CCR7 auch die Einwanderung von reifen DC in die T-Zellzone steuert^{47, 48}, scheint für die zunächst stattfindende Mobilisation der Zellen ein unabhängiger Weg zu existieren. Ob CCR7-defiziente DC nach LPS-Gabe direkt in die T-Zellzone wandern können, lässt sich mit CCR7^{-/-}-Tieren nicht eindeutig klären, da eine definierte T-Zellzone

fehlt. Zur Klärung dieser Frage könnten jedoch Knochenmarkschimäre Tiere mit 50% wt- und 50% CCR7^{-/-}-Zellen benutzt werden. In diesem Fall ließe sich das Verhalten der CCR7^{-/-}-DC in einer anatomisch normalen Milz genauer untersuchen und charakterisieren.

Zwischen den beiden in der Milz vorkommenden DC Populationen scheinen deutliche Unterschiede zu bestehen. Unklar ist bis jetzt, ob diese Zellen aus verschiedenen Vorläuferpopulationen gebildet werden¹³¹⁻¹³⁶ und deshalb unterschiedliche Positionen und Funktionen in der Milz einnehmen. Obwohl lymphoide Vorläufer (CLP, *common lymphoid progenitor*) hauptsächlich CD8⁺-DC zu bilden scheinen, sind myeloide Vorläufer (CMP, *common myeloid progenitor*) ebenfalls in der Lage diese Zellen zu bilden. Auf Grund der höheren Frequenz der lymphoiden Vorläufer im Knochenmark lässt sich allerdings nicht genau vorhersagen, ob CD8⁺-DC lymphoiden oder myeloiden Ursprungs sind. Es lässt sich somit nur spekulieren, warum CD8⁺- und CD8⁻-DC verschieden sind, klar wird jedoch, dass die Signalwege und Funktionalitäten in diesen beiden DC-Subpopulationen deutlich unterscheidbar sind⁵³.

4.4 CD83-Expression im murinen Immunsystem

Obwohl die publizierten Befunde mit CD83-defizienten Mäusen keinen Rückschluss auf die Funktion von CD83 auf DC der Maus zulassen²⁴, sprechen viele neue Befunde im murinen und humanen System für eine wichtige Funktion und großes therapeutisches Potential von CD83. Die meisten Studien wurden jedoch mit humanen Zellen durchgeführt, da für das Maus-System kein funktionierender und spezifischer Antikörper zur Verfügung stand.

Die in dieser Arbeit charakterisierten monoklonalen Antikörper gegen murines CD83 (**Abbildung 10**) boten somit die Möglichkeit, die Expression von CD83 im Immunsystem der Maus unter verschiedenen Bedingungen zu studieren.

Es zeigte sich, wie zunächst erwartet, dass *in vitro*-differenzierte DC im unreifen Zustand kein, im maturierten Zustand jedoch deutlich CD83 exprimieren (**Abbildung 11a**). Interessanterweise war die Expressionshöhe von CD83 nicht von der Art des Reifungs-Stimulus abhängig. Sowohl durch *Cluster*-Auflösung (Spontan-Maturation) als auch durch verschiedene starke Reifungsstimuli wurde stets die maximale Expressionshöhe erreicht. Dies steht im Gegensatz zu der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86, die abhängig von der Art des Stimulus deutlich stärker reguliert werden (**Abbildung 11b**).

Diese Befunde und weitere neuere Ergebnisse sprechen dafür, dass eine feinere Differenzierung zwischen verschiedenen DC getroffen werden muss. Die klassische Unterscheidung zwischen reifen und unreifen DC ist zwar sinnvoll, zusätzlich muss jedoch der Differenzierungsstatus einer ausgereiften DC eingehender betrachtet werden. Es zeigt sich

immer mehr, dass die Reifung von DC einer hohen Plastizität unterliegt und hauptsächlich vom Maturations-Stimulus moduliert wird. Verschiedene TLR-Liganden, führen zu deutlich unterschiedlichen Expression von kostimulatorischen Molekülen, Zytokin-Expression sowie T-Zell-stimulatorischen Fähigkeiten der DC. Während einige Liganden oder Behandlungen die Funktion der DC in Richtung Toleranz verschieben⁴⁰, so führen andere Stimulantien allein oder in Synergie zu einer hohen Zytokin-Freisetzung¹³⁷ oder Polarisation von T-Zellen in Richtung einer Th1-, Th2-^{138, 139}, oder Th17-Antwort¹⁴⁰. All diese Unterschiede bei der DC-Reifung scheinen zur Feinsteuerung der Immunantwort durch DC beizutragen, sind bis jetzt jedoch nur wenig untersucht.

Die hier erhobenen Daten zeigen deutlich, dass die CD83-Expression auf DC nur eine Aussage darüber zulässt, ob eine DC reif oder unreif ist, jedoch nichts über deren spätere Funktion bei der T-Zell-Stimulation wiedergibt.

Auch der zeitliche Verlauf der CD83-Oberflächen-Expression unterscheidet sich deutlich von den anderen untersuchten kostimulatorischen Markern. Während die anderen Moleküle eine maximale Expression erreichen und diese konstant bleibt, findet man CD83 schnell auf der Oberfläche, nach 48h ist seine Präsenz jedoch stark reduziert (**Abbildung 11c**). Hierbei könnte es sich um eine von extrazellulären Proteasen vermittelte Spaltung von CD83 von der Zelloberfläche handeln, die dazu führt das CD83 als lösliche Form freigesetzt wird (*shedding*). Obwohl keine direkten Beweise hierfür vorliegen, würde diese Vermutung den Befunden im humanen System entsprechen^{17, 141} in denen lösliches CD83 zur Regulation der T-Zell-Proliferation beiträgt¹⁴². Einen Hinweis auf *shedding* könnte sowohl die CD83-mRNA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation (*real time*-PCR) oder die Bestimmung von löslichem CD83 im Zellüberstand Aufschluss geben.

Auf DC *in vivo* zeigte sich, dass die Expression von CD83 stets mit der Höhe der MHC II-Expression korreliert (**Abbildung 12**). In der Milz findet sich nur wenig CD83-Expression auf DC, da die meisten Zellen unreif sind. In den Lymphknoten findet man ein deutliches Signal von CD83 auf DC, die hoch MHC II exprimieren. Diese Expression konnte durch subkutane Injektion von verschiedenen TLR-Liganden jedoch nicht weiter gesteigert werden (Daten nicht dargestellt), was mit den Ergebnissen aus der *in vitro*-Stimulation gut übereinstimmt.

Weiterhin konnten verschiedene Zellpopulationen des murinen Immunsystems untersucht werden. Auf den meisten Zellen ist CD83 nicht exprimiert. Hierzu gehören, T-Zellen, NK, Zellen und plasmazytoide DC (**Tabelle 3**). B-Zellen allerdings zeigten in den verschiedenen Organen zum Teil deutliche Expression von CD83. Diese Expression war in Organen

vorhanden, die zum GALT (*gut associated lymphoid tissue*) zählen und dem Darm assoziiert sind. Im mesenterischen Lymphknoten und in den Peyerschen Platten fanden sich deutlich B-Zellen, die CD83 positiv waren. Anscheinend befinden sich die B-Zellen in diesen Organen in einem Milieu, das zur Expression von CD83 auf einigen Zellen führt. B-Zellen der Milz und der peripheren Lymphknoten zeigten nur sehr schwache Expression von CD83 (**Abbildung 13**). Sobald diese Zellen allerdings isoliert und mittels TLR-Liganden stimuliert wurden, so begannen auch sie damit CD83 auf der Oberfläche zu exprimieren (**Abbildung 14a**). Auch hier zeigte sich, dass die Zellen zunächst CD83 auf der Oberfläche tragen und diese Expression mit der Zeit wieder verlieren (**Abbildung 14b**). Wiederum könnte man vermuten, dass CD83 von der Oberfläche freigesetzt wird und somit als lösliche Form an das umgebende Medium freigesetzt wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CD83 zwar ein Maturations-Marker auf DC der Maus ist, seine Expression jedoch keine Aussage über den immunologischen Status der DC zulässt. Die Polarisationsfähigkeit der DC oder ihre Fähigkeit, Toleranz zu induzieren, lässt sich mit diesem Molekül nicht bestimmen. Weiterhin beschreiben die hier gemachten Befunde CD83 als Molekül, welches nicht ausschließlich von DC, sondern unter bestimmten Bedingungen auch von B-Zellen exprimiert wird. Die genaue Funktion von CD83 bleibt zwar weiterhin nicht vollständig geklärt, die hier präsentierten Ergebnisse geben jedoch einen ersten Einblick in die Regulation von CD83 im immunologischen Geschehen.

5 Schlussfolgerungen

Dendritische Zellen sind wichtige Zellen des Immunsystems, sowohl für die Etablierung einer adaptiven Immunantwort als auch für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz. Bei vielen Infektionen durch Parasiten (*Leishmania*¹⁴³⁻¹⁴⁶), Bakterien oder Viren¹⁴⁷ spielt die korrekte Funktionsweise der DC eine bedeutende Rolle und trägt maßgeblich zur Bekämpfung der Pathogene bei. Zurzeit wird der Ansatz einer DC basierten Immunisierung gegen verschiedene Pathogene oder Krebs intensiv erforscht und besitzt erhebliches Potenzial¹⁴⁸⁻¹⁵². Die Rolle von dendritischen Zellen bei Autoimmunerkrankungen wird intensiv diskutiert (z.B. Psoriasis¹⁵³⁻¹⁵⁶, Lupus erythematosus^{157, 158}) und ist bei der Infektion mit HIV ebenfalls evident¹⁵⁹⁻¹⁶³. Die Wanderung dieser Zellen und die Möglichkeit, sie zu beeinflussen stellt eine große therapeutische Hoffnung für die Behandlung vieler Krankheiten dar. In einigen Fällen möchte man die Wanderung dieser Zellen unterstützen, um eine stärkere Immunantwort zu erzeugen. In anderen Fällen scheint es sinnvoll die Migration von DC und somit ihre stimulatorischen Fähigkeiten zu unterbinden. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass S1P-Rezeptoren einen Einfluss auf die Wanderung und die Positionierung der dendritischen Zellen in den Geweben haben. Die S1P/S1P-Rezeptor-Wechselwirkungen stellen somit ein mögliches therapeutisches Ziel dar, um in die Funktion dendritischer Zellen einzugreifen. Weiterhin lassen die hier präsentierten Daten die Vermutung zu, dass der immunsuppressive Effekt von FTY720 zu einem Teil an der Veränderung der dendritischen Zellfunktionen liegen könnte.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass CD83 auf dendritischen Zellen der Maus in Abhängigkeit zum Reifungsstatus exprimiert wird. Obwohl CD83 eine wichtige Rolle bei der Etablierung von T-Zell-Antworten zu haben scheint, ist seine Expression nicht wie bei anderen kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86) durch die Art des mikrobiellen Stimulus reguliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD83 nicht ausschließlich auf dendritischen Zellen, sondern unter bestimmten Bedingungen auch auf B-Zellen exprimiert wird. CD83 stellt ebenso wie S1P-Rezeptoren ein potentiell Zielmolekül für den Eingriff in durch dendritische Zellen vermittelte Immunantworten dar. Die hier präsentierten Daten geben somit einen weiteren Einblick in die Expression und mögliche Funktion dieses Moleküls.

6 Abkürzungen

CCR7: CC-Chemokin-Rezeptor 7

CFSE: Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester

DC: dendritische Zelle

FITC: Fluorescein-Isothiocyanat

GAPDH: Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase

GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor

i.p.: intra-peritoneal

LN: Lymphknoten (*lymph node*)

LPS: Lipopolysaccharid

mAB: monoklonaler Antikörper (*monoclonal antibody*)

mes LN: mesenterialer Lymphknoten

MFI: Mittlere Fluoreszenz-Intensität

MHC: Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex*)

per LN: periphere Lymphknoten

PGE2: Prostaglandin-E2

s.c.: subkutan

S1P: Sphingosin-1-Phosphat

S1P₁₋₅: Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1-5

SA: Standardabweichung

SPF: spezifiziert pathogenfrei

TAMRA: Tetramethylrhodamin

TLR: zu Toll (*drosophila melanogaster*) homologer Rezeptor (*toll like receptor*)

wt: Wildtyp

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*)

7 Literatur

1. A. E. Morelli, A. F. Zahorchak, A. T. Larregina, B. L. Colvin, A. J. Logar, T. Takayama, L. D. Falo and A. W. Thomson. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood*. 2001;98:1512-23.
2. S. Burgdorf, A. Kautz, V. Bohnert, P. A. Knolle and C. Kurts. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science*. 2007;316:612-6.
3. J. Banchereau and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-52.
4. E. S. Trombetta, M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert and I. Mellman. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science*. 2003;299:1400-3.
5. M. Cella, A. Engering, V. Pinet, J. Pieters and A. Lanzavecchia. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 1997;388:782-7.
6. G. van Niel, R. Wubbolts, T. Ten Broeke, S. I. Buschow, F. A. Ossendorp, C. J. Melief, G. Raposo, B. W. van Balkom and W. Stoorvogel. Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity*. 2006;25:885-94.
7. J. S. Shin, M. Ebersold, M. Pypaert, L. Delamarre, A. Hartley and I. Mellman. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*. 2006;444:115-8.
8. C. Reis e Sousa. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*. 2004;16:27-34.
9. F. Sallusto and A. Lanzavecchia. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179:1109-18.
10. A. Kissenpfennig, S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust and B. Malissen. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*. 2005;22:643-54.
11. M. L. Dustin, S. Y. Tseng, R. Varma and G. Campi. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:512-6.
12. T. R. Mempel, S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 2004;427:154-9.
13. N. S. Wilson, D. El-Sukkari, G. T. Belz, C. M. Smith, R. J. Steptoe, W. R. Heath, K. Shortman and J. A. Villadangos. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood*. 2003;102:2187-94.

14. M. Sixt, N. Kanazawa, M. Selg, T. Samson, G. Roos, D. P. Reinhardt, R. Pabst, M. B. Lutz and L. Sorokin. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity*. 2005;22:19-29.
15. N. Scholler, M. Hayden-Ledbetter, K. E. Hellstrom, I. Hellstrom and J. A. Ledbetter. CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 2001;166:3865-72.
16. M. Lechmann, N. Kotzor, E. Zinser, A. T. Prechtel, H. Sticht and A. Steinkasserer. CD83 is a dimer: Comparative analysis of monomeric and dimeric isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329:132-9.
17. B. D. Hock, M. Kato, J. L. McKenzie and D. N. Hart. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol*. 2001;13:959-67.
18. M. Lechmann, S. Berchtold, J. Hauber and A. Steinkasserer. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol*. 2002;23:273-5.
19. M. Lechmann, D. J. Krooshoop, D. Dudziak, E. Kremmer, C. Kuhnt, C. G. Figdor, G. Schuler and A. Steinkasserer. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;194:1813-21.
20. E. Zinser, M. Lechmann, A. Golka, M. B. Lutz and A. Steinkasserer. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *J Exp Med*. 2004;200:345-51.
21. N. Scholler, M. Hayden-Ledbetter, A. Dahlin, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom and J. A. Ledbetter. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol*. 2002;168:2599-602.
22. B. D. Hock, L. F. Haring, A. Steinkasserer, K. G. Taylor, W. N. Patton and J. L. McKenzie. The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res*. 2004;28:237-41.
23. B. D. Hock, J. L. McKenzie, W. N. Patton, L. F. Haring, Y. Yang, Y. Shen, E. H. Estey and M. Albitar. The clinical significance of soluble CD86 levels in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2003;98:1681-8.
24. Y. Fujimoto, L. Tu, A. S. Miller, C. Bock, M. Fujimoto, C. Doyle, D. A. Steeber and T. F. Tedder. CD83 expression influences CD4⁺ T cell development in the thymus. *Cell*. 2002;108:755-67.
25. N. Hirano, M. O. Butler, Z. Xia, S. Ansen, M. S. von Bergwelt-Baildon, D. Neuberg, G. J. Freeman and L. M. Nadler. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8⁺ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood*. 2006;107:1528-36.
26. M. Breloer, B. Kretschmer, K. Luthje, S. Ehrlich, U. Ritter, T. Bickert, C. Steeg, S. Fillatreau, K. Hoehlig, V. Lampropoulou and B. Fleischer. CD83 is a regulator of murine B cell function in vivo. *Eur J Immunol*. 2007;37:634-48.

27. K. Luthje, S. O. Cramer, S. Ehrlich, A. Veit, C. Steeg, B. Fleischer, A. Bonin and M. Breloer. Transgenic expression of a CD83-immunoglobulin fusion protein impairs the development of immune-competent CD4-positive T cells. *Eur J Immunol.* 2006;36:2035-45.
28. M. B. Lutz, N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani and G. Schuler. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999;223:77-92.
29. W. R. Heath, G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone and J. A. Villadangos. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004;199:9-26.
30. J. L. Pooley, W. R. Heath and K. Shortman. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol.* 2001;166:5327-30.
31. G. T. Belz, C. M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F. R. Carbone and W. R. Heath. Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol.* 2004;172:1996-2000.
32. Y. Chung, J. H. Chang, M. N. Kweon, P. D. Rennert and C. Y. Kang. CD8alpha-11b+ dendritic cells but not CD8alpha+ dendritic cells mediate cross-tolerance toward intestinal antigens. *Blood.* 2005;106:201-6.
33. M. L. del Rio, J. I. Rodriguez-Barbosa, E. Kremmer and R. Forster. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol.* 2007;178:6861-6.
34. L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002;196:1627-38.
35. D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001;194:769-79.
36. K. Liu, T. Iyoda, M. Saternus, Y. Kimura, K. Inaba and R. M. Steinman. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med.* 2002;196:1091-7.
37. R. M. Steinman. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS.* 2003;111:675-697.
38. T. Brocker. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med.* 1997;186:1223-32.
39. T. Brocker, M. Riedinger and K. Karjalainen. Targeted Expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II Molecules Demonstrates that Dendritic Cells Can Induce Negative but Not Positive Selection of Thymocytes In Vivo. *J. Exp. Med.* 1997;185:541-550.

40. M. B. Lutz and G. Schuler. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002;23:445-9.
41. H. C. Probst, J. Lagnel, G. Kollias and M. van den Broek. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8⁺ T cell tolerance. *Immunity.* 2003;18:713-20.
42. M. F. Bachmann, M. Kopf and B. J. Marsland. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:159-64.
43. P. M. Murphy, M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52:145-76.
44. G. J. Randolph, S. Beaulieu, S. Lebecque, R. M. Steinman and W. A. Muller. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science.* 1998;282:480-3.
45. F. Ginhoux, F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X. M. Dai, E. R. Stanley, G. J. Randolph and M. Merad. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol.* 2006;7:265-73.
46. A. Vecchi, L. Massimiliano, S. Ramponi, W. Luini, S. Bernasconi, R. Bonecchi, P. Allavena, M. Parmentier, A. Mantovani and S. Sozzani. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 1999;66:489-94.
47. R. Forster, A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf and M. Lipp. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 1999;99:23-33.
48. T. Junt, E. Scandella, R. Forster, P. Krebs, S. Krautwald, M. Lipp, H. Hengartner and B. Ludewig. Impact of CCR7 on Priming and Distribution of Antiviral Effector and Memory CTL. *J Immunol.* 2004;173:6684-6693.
49. E. Scandella, K. Fink, T. Junt, B. M. Senn, E. Lattmann, R. Forster, H. Hengartner and B. Ludewig. Dendritic cell-independent B cell activation during acute virus infection: a role for early CCR7-driven B-T helper cell collaboration. *J Immunol.* 2007;178:1468-76.
50. L. Ohl, M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning and R. Forster. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. *Immunity.* 2004;21:279-88.
51. T. Worbs, U. Bode, S. Yan, M. W. Hoffmann, G. Hintzen, G. Bernhardt, R. Forster and O. Pabst. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med.* 2006;203:519-27.
52. G. Hintzen, L. Ohl, M. L. del Rio, J. I. Rodriguez-Barbosa, O. Pabst, J. R. Kocks, J. Krege, S. Hardtke and R. Forster. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies

on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol.* 2006;177:7346-54.

53. D. Dudziak, A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science.* 2007;315:107-11.

54. A. T. Kamath, S. Henri, F. Battye, D. F. Tough and K. Shortman. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood.* 2002;100:1734-41.

55. Y. G. Wang, K. D. Kim, J. Wang, P. Yu and Y. X. Fu. Stimulating lymphotoxin beta receptor on the dendritic cells is critical for their homeostasis and expansion. *J Immunol.* 2005;175:6997-7002.

56. K. Kabashima, T. A. Banks, K. M. Ansel, T. T. Lu, C. F. Ware and J. G. Cyster. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity.* 2005;22:439-50.

57. K. Liu, C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh and M. Nussenzweig. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol.* 2007;8:578-83.

58. P. Hanel, P. Andreani and M. H. Graler. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *Faseb J.* 2007.

59. T. Fujita, K. Inoue, S. Yamamoto, T. Ikumoto, S. Sasaki, R. Toyama, K. Chiba, Y. Hoshino and T. Okumoto. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo).* 1994;47:208-15.

60. S. Suzuki, S. Enosawa, T. Kakefuda, T. Shinomiya, M. Amari, S. Naoe, Y. Hoshino and K. Chiba. A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation.* 1996;61:200-5.

61. B. Zemann, B. Kinzel, M. Muller, R. Reuschel, D. Mechtcheriakova, N. Urtz, F. Bornancin, T. Baumruker and A. Billich. Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood.* 2006;107:1454-8.

62. V. Brinkmann, D. D. Pinschewer, L. Feng and S. Chen. FTY720: altered lymphocyte traffic results in allograft protection. *Transplantation.* 2001;72:764-9.

63. T. Bohler, J. Waiser, M. Schutz, M. Friedrich, R. Schotschel, S. Reinhold, R. Schmouder, K. Budde and H. H. Neumayer. FTY 720A mediates reduction of lymphocyte counts in human renal allograft recipients by an apoptosis-independent mechanism. *Transpl Int.* 2000;13 Suppl 1:S311-3.

64. V. Brinkmann, M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C. A. Foster, M. Zollinger and K. R. Lynch. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem.* 2002;277:21453-7.

65. S. G. Payne, S. Milstien and S. Spiegel. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 2002;531:54-7.
66. S. Spiegel and S. Milstien. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:397-407.
67. Y. Liu, R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, V. E. Nava, S. S. Chae, M. J. Lee, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel and R. L. Proia. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 2000;106:951-61.
68. M. G. Sanna, J. Liao, E. Jo, C. Alfonso, M. Y. Ahn, M. S. Peterson, B. Webb, S. Lefebvre, J. Chun, N. Gray and H. Rosen. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem.* 2004;279:13839-48.
69. J. R. Nofer, M. van der Giet, M. Tolle, I. Wolinska, K. von Wnuck Lipinski, H. A. Baba, U. J. Tietge, A. Godecke, I. Ishii, B. Kleuser, M. Schafers, M. Fobker, W. Zidek, G. Assmann, J. Chun and B. Levkau. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004;113:569-81.
70. E. Jo, M. G. Sanna, P. J. Gonzalez-Cabrera, S. Thangada, G. Tigyi, D. A. Osborne, T. Hla, A. L. Parrill and H. Rosen. S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. *Chem Biol.* 2005;12:703-15.
71. Y. Fujiwara, D. A. Osborne, M. D. Walker, D. A. Wang, D. A. Bautista, K. Liliom, J. R. Van Brocklyn, A. L. Parrill and G. Tigyi. Identification of the hydrophobic ligand binding pocket of the S1P1 receptor. *J Biol Chem.* 2006.
72. A. J. Ridley. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001;114:2713-22.
73. C. A. Swetman, Y. Leverrier, R. Garg, C. H. Gan, A. J. Ridley, D. R. Katz and B. M. Chain. Extension, retraction and contraction in the formation of a dendritic cell dendrite: distinct roles for Rho GTPases. *Eur J Immunol.* 2002;32:2074-83.
74. M. A. West, A. R. Prescott, E. L. Eskelinen, A. J. Ridley and C. Watts. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol.* 2000;10:839-48.
75. W. S. Garrett, L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galan and I. Mellman. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell.* 2000;102:325-34.
76. F. Benvenuti, S. Hugues, M. Walmsley, S. Ruf, L. Fetler, M. Popoff, V. L. Tybulewicz and S. Amigorena. Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science.* 2004;305:1150-3.
77. M. L. Allende, J. L. Dreier, S. Mandala and R. L. Proia. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem.* 2004;279:15396-401.

78. M. Matloubian, C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia and J. G. Cyster. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427:355-60.
79. G. Dorsam, M. H. Graeler, C. Seroogy, Y. Kong, J. K. Voice and E. J. Goetzl. Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. *J Immunol*. 2003;171:3500-7.
80. G. Cinamon, M. Matloubian, M. J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R. L. Proia and J. G. Cyster. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol*. 2004;5:713-20.
81. K. Arikawa, N. Takuwa, H. Yamaguchi, N. Sugimoto, J. Kitayama, H. Nagawa, K. Takehara and Y. Takuwa. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem*. 2003;278:32841-51.
82. S. Siehler and D. R. Manning. Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:94-9.
83. N. Sugimoto, N. Takuwa, H. Okamoto, S. Sakurada and Y. Takuwa. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol*. 2003;23:1534-45.
84. A. H. Yang, I. Ishii and J. Chun. In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:197-203.
85. H. Okamoto, N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu and Y. Takuwa. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol*. 2000;20:9247-61.
86. N. Ancellin and T. Hla. Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem*. 1999;274:18997-9002.
87. F. Liu, A. D. Verin, P. Wang, R. Day, R. P. Wersto, F. J. Chrest, D. K. English and J. G. Garcia. Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(α 2)-linked Rho kinase activity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24:711-9.
88. I. Girkontaite, V. Sakk, M. Wagner, T. Borggreffe, K. Tedford, J. Chun and K. D. Fischer. The sphingosine-1-phosphate (S1P) lysophospholipid receptor S1P3 regulates MAdCAM-1+ endothelial cells in splenic marginal sinus organization. *J Exp Med*. 2004;200:1491-501.
89. T. Kohno, H. Matsuyuki, Y. Inagaki and Y. Igarashi. Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells. *Genes Cells*. 2003;8:685-97.

90. W. Wang, M. H. Graeler and E. J. Goetzl. Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *Faseb J.* 2005;19:1731-3.
91. M. H. Graeler, R. Grosse, A. Kusch, E. Kremmer, T. Gudermann and M. Lipp. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J Cell Biochem.* 2003;89:507-19.
92. M. Graeler and E. J. Goetzl. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *Faseb J.* 2002;16:1874-8.
93. C. Jaillard, S. Harrison, B. Stankoff, M. S. Aigrot, A. R. Calver, G. Duddy, F. S. Walsh, M. N. Pangalos, N. Arimura, K. Kaibuchi, B. Zalc and C. Lubetzki. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 2005;25:1459-69.
94. H. Nakano, M. Yanagita and M. D. Gunn. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;194:1171-8.
95. D. J. Cassell and R. H. Schwartz. A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J Exp Med.* 1994;180:1829-40.
96. G. J. Silverman. Targeting of B cells in SLE: rationale and therapeutic opportunities. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2006;64:51-6.
97. C. Pasare and R. Medzhitov. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature.* 2005;438:364-8.
98. A. K. Heer, A. Shamshiev, A. Donda, S. Uematsu, S. Akira, M. Kopf and B. J. Marsland. TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses. *J Immunol.* 2007;178:2182-91.
99. H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408:740-5.
100. V. Hornung, S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002;168:4531-7.
101. S. L. Peng. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:230-6.
102. L. Riol-Blanco, N. Sanchez-Sanchez, A. Torres, A. Tejedor, S. Narumiya, A. L. Corbi, P. Sanchez-Mateos and J. L. Rodriguez-Fernandez. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol.* 2005;174:4070-80.

103. G. T. Belz, W. R. Heath and F. R. Carbone. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:463-8.
104. P. J. Leenen, K. Radosevich, J. S. Voerman, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann and W. van Ewijk. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol.* 1998;160:2166-73.
105. C. Reis e Sousa, S. Hieny, T. Schariton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain and A. Sher. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med.* 1997;186:1819-29.
106. X. Zhang, H. Huang, J. Yuan, D. Sun, W. S. Hou, J. Gordon and J. Xiang. CD4-8-dendritic cells prime CD4⁺ T regulatory 1 cells to suppress antitumor immunity. *J Immunol.* 2005;175:2931-7.
107. S. Mori, H. Nakano, K. Aritomi, C. R. Wang, M. D. Gunn and T. Kakiuchi. Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses. *J Exp Med.* 2001;193:207-18.
108. J. R. Kocks, A. C. Davalos-Missslitz, G. Hintzen, L. Ohl and R. Forster. Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue. *J Exp Med.* 2007;204:723-34.
109. P. Stoitzner, C. H. Tripp, A. Eberhart, K. M. Price, J. Y. Jung, L. Bursch, F. Ronchese and N. Romani. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7783-8.
110. G. M. Woods, Y. P. Chen, A. L. Dewar, K. V. Doherty, B. H. Toh and H. K. Muller. Prevention of autoimmunity by induction of cutaneous tolerance. *Cell Immunol.* 2001;207:1-5.
111. D. H. Kaplan, M. C. Jenison, S. Saeland, W. D. Shlomchik and M. J. Shlomchik. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity.* 2005;23:611-20.
112. G. Henning, L. Ohl, T. Junt, P. Reiterer, V. Brinkmann, H. Nakano, W. Hohenberger, M. Lipp and R. Forster. CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720. *J Exp Med.* 2001;194:1875-81.
113. O. Pabst, H. Herbrand, S. Willenzon, T. Worbs, A. Schippers, W. Muller, G. Bernhardt and R. Forster. Enhanced FTY720-mediated lymphocyte homing requires G alpha i signaling and depends on beta 2 and beta 7 integrin. *J Immunol.* 2006;176:1474-80.
114. V. Brinkmann, J. G. Cyster and T. Hla. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant.* 2004;4:1019-25.

115. C. G. Lo, Y. Xu, R. L. Proia and J. G. Cyster. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med.* 2005;201:291-301.
116. M. Idzko, E. Panther, S. Corinti, A. Morelli, D. Ferrari, Y. Herouy, S. Dichmann, M. Mockenhaupt, P. Gebicke-Haerter, F. Di Virgilio, G. Girolomoni and J. Norgauer. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *Faseb J.* 2002;16:625-7.
117. S. Eigenbrod, R. Derwand, V. Jakl, S. Endres and A. Eigler. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration, endocytosis and apoptosis of dendritic cells. *Immunol Invest.* 2006;35:149-65.
118. I. Just, F. Hofmann and K. Aktories. Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;250:55-83.
119. I. Just, F. Hofmann, H. Genth and R. Gerhard. Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int J Med Microbiol.* 2001;291:243-50.
120. H. Barth, F. Hofmann, C. Olenik, I. Just and K. Aktories. The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect Immun.* 1998;66:1364-9.
121. I. Just, S. J., H. F. and K. Aktories. *Clostridium difficile* Toxin B as a probe for Rho GTPases. 1997.
122. J. Schirmer and K. Aktories. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1673:66-74.
123. J. H. Paik, S. Chae, M. J. Lee, S. Thangada and T. Hla. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem.* 2001;276:11830-7.
124. M. H. Graler and E. J. Goetzl. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *Faseb J.* 2004;18:551-3.
125. S. H. Wei, H. Rosen, M. P. Matheu, M. G. Sanna, S. K. Wang, E. Jo, C. H. Wong, I. Parker and M. D. Cahalan. Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nat Immunol.* 2005;6:1228-35.
126. M. G. Sanna, S. K. Wang, P. J. Gonzalez-Cabrera, A. Don, D. Marsolais, M. P. Matheu, S. H. Wei, I. Parker, E. Jo, W. C. Cheng, M. D. Cahalan, C. H. Wong and H. Rosen. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol.* 2006;2:434-41.
127. M. Idzko, H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, T. Muller, T. Soullie, M. A. Willart, D. Hijdra, H. C. Hoogsteden and B. N. Lambrecht. Local application of FTY720 to

the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest.* 2006;116:2935-44.

128. D. Oz-Arslan, W. Ruscher, D. Myrtek, M. Ziemer, Y. Jin, B. B. Damaj, S. Sorichter, M. Idzko, J. Norgauer and A. A. Maghazachi. IL-6 and IL-8 release is mediated via multiple signaling pathways after stimulating dendritic cells with lysophospholipids. *J Leukoc Biol.* 2006;80:287-97.

129. A. Martino, E. Volpe, G. Auricchio, V. Izzi, F. Poccia, F. Mariani, V. Colizzi and P. M. Baldini. Sphingosine 1-Phosphate Interferes on the Differentiation of Human Monocytes into Competent Dendritic Cells. *Scand J Immunol.* 2007;65:84-91.

130. T. T. Lu and J. G. Cyster. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science.* 2002;297:409-12.

131. M. G. Manz, D. Traver, K. Akashi, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman and I. L. Weissman. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:167-73; discussion 173-4.

132. M. G. Manz, D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman and K. Akashi. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood.* 2001;97:3333-41.

133. S. Naik, D. Vremec, L. Wu, M. O'Keeffe and K. Shortman. CD8alpha+ mouse spleen dendritic cells do not originate from the CD8alpha- dendritic cell subset. *Blood.* 2003;102:601-4.

134. S. H. Naik, D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe and K. Shortman. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol.* 2006;7:663-71.

135. D. Traver, K. Akashi, M. Manz, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman and I. L. Weissman. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science.* 2000;290:2152-4.

136. L. Wu, A. D'Amico, H. Hochrein, M. O'Keeffe, K. Shortman and K. Lucas. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood.* 2001;98:3376-82.

137. G. Napolitani, A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto and A. Lanzavecchia. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005;6:769-76.

138. A. Boonstra, C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu and A. O'Garra. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med.* 2003;197:101-9.

139. E. C. de Jong, P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh and M. L. Kapsenberg. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol.* 2002;168:1704-9.

140. H. Soares, H. Waechter, N. Glaichenhaus, E. Mougneau, H. Yagita, O. Mizenina, D. Dudziak, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman. A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN- γ by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med.* 2007.
141. B. Senechal, A. M. Boruchov, J. L. Reagan, D. N. Hart and J. W. Young. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood.* 2004;103:4207-15.
142. D. Dudziak, F. Nimmerjahn, G. W. Bornkamm and G. Laux. Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation. *J Immunol.* 2005;174:6672-6.
143. Y. Campos-Martin, M. Colmenares, B. Gozalbo-Lopez, M. Lopez-Nunez, P. B. Savage and E. Martinez-Naves. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. *J Immunol.* 2006;176:6172-9.
144. E. Caparros, D. Serrano, A. Puig-Kroger, L. Riol, F. Lasala, I. Martinez, F. Vidal-Vanaclocha, R. Delgado, J. L. Rodriguez-Fernandez, L. Rivas, A. L. Corbi and M. Colmenares. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology.* 2005;210:185-93.
145. M. Colmenares, A. L. Corbi, S. J. Turco and L. Rivas. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol.* 2004;172:1186-90.
146. M. Ato, S. Stager, C. R. Engwerda and P. M. Kaye. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol.* 2002;3:1185-91.
147. M. Rescigno and P. Borrow. The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell.* 2001;106:267-70.
148. L. Fong, D. Brockstedt, C. Benike, J. K. Breen, G. Strang, C. L. Ruegg and E. G. Engleman. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2001;167:7150-6.
149. L. Fong, D. Brockstedt, C. Benike, L. Wu and E. G. Engleman. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol.* 2001;166:4254-9.
150. L. Fong and E. G. Engleman. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:245-73.
151. L. Fong, Y. Hou, A. Rivas, C. Benike, A. Yuen, G. A. Fisher, M. M. Davis and E. G. Engleman. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:8809-14.
152. R. M. Steinman and M. Dhodapkar. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer.* 2001;94:459-73.

153. J. D. Bos, M. A. de Rie, M. B. Teunissen and G. Piskin. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. *Br J Dermatol.* 2005;152:1098-107.
154. O. Boyman, C. Conrad, C. Dudli, E. Kielhorn, B. J. Nickoloff and F. O. Nestle. Activation of dendritic antigen-presenting cells expressing common heat shock protein receptor CD91 during induction of psoriasis. *Br J Dermatol.* 2005;152:1211-8.
155. T. N. Dam, B. Moller, J. Hindkjaer and K. Kragballe. The vitamin D3 analog calcipotriol suppresses the number and antigen-presenting function of Langerhans cells in normal human skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1996;1:72-7.
156. A. M. Jensen, M. B. Llado, L. Skov, E. R. Hansen, J. K. Larsen and O. Baadsgaard. Calcipotriol inhibits the proliferation of hyperproliferative CD29 positive keratinocytes in psoriatic epidermis in the absence of an effect on the function and number of antigen-presenting cells. *Br J Dermatol.* 1998;139:984-91.
157. P. Blanco, A. K. Palucka, M. Gill, V. Pascual and J. Banchereau. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science.* 2001;294:1540-3.
158. A. Mehling, K. Loser, G. Varga, D. Metze, T. A. Luger, T. Schwarz, S. Grabbe and S. Beissert. Overexpression of CD40 ligand in murine epidermis results in chronic skin inflammation and systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 2001;194:615-28.
159. D. S. Kwon, G. Gregorio, N. Bitton, W. A. Hendrickson and D. R. Littman. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity.* 2002;16:135-44.
160. T. B. Geijtenbeek, A. Engering and Y. Van Kooyk. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol.* 2002;71:921-31.
161. T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor and Y. van Kooyk. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000;100:587-97.
162. T. B. Geijtenbeek, G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, E. Krieger, G. Vriend, C. G. Figdor and Y. van Kooyk. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem.* 2002;277:11314-20.
163. T. B. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, C. G. Figdor and Y. van Kooyk. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 receptor present in placenta that infects T cells in trans-a review. *Placenta.* 2001;22 Suppl A:S19-23.

Anhang

Erklärung über den Beitrag von N. Czeloth zu den Publikationen

1) **N. Czeloth**, G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth and R. Forster. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. J Immunol. 2005;175:2960-7.

Planung, Durchführung, Auswertung der Experimente. Schreiben der Publikation.

2) **N. Czeloth**, A. Schippers, W. Muller, B. Eilers, G. Bernhardt and R. Forster. Sphingosine 1-Phosphate Receptor S1P1 regulates Positioning of Dendritic Cells in the Spleen. Manuskript eingereicht, J Immunol. 2007.

Planung, Durchführung, Auswertung der Experimente, technische Hilfe durch Birgit Eilers. Schreiben der Publikation.

3) L. Ohl, M. Mohaupt, **N. Czeloth**, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning and R. Forster. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. Immunity. 2004;21:279-88.

Planung, Durchführung, Auswertung der Migrationsexperimente mit *in vitro* differenzierten DC (Abb. 2).

Publikationen

Sphingosine-1-Phosphate Mediates Migration of Mature Dendritic Cells¹

Niklas Czeloth,* Günter Bernhardt,* Fred Hofmann,† Harald Genth,† and Reinhold Förster^{2*}

Sphingosine-1-phosphate (S1P) represents a potent modulator of diverse cellular activities, including lymphocyte trafficking and maintenance of lymphocyte homeostasis. The five known receptors for S1P (S1P₁₋₅) belong to the family of G protein-coupled receptors. Upon binding S1P, they act downstream via heterotrimeric G proteins on members of the small GTPase family (Cdc42/Rac/Rho), evoking a S1P receptor-dependent activation pattern of Cdc42, Rac, and Rho, respectively. This, in turn, triggers cytoskeletal rearrangements determining cellular morphology and movement. In this study we investigated the effects of S1P on murine dendritic cells (DC). Mature DC, but not immature *in vitro* differentiated DC, were found to migrate to S1P, a phenomenon that correlated to the up-regulation of S1P₁ and S1P₃ in maturing DC. The same pattern of S1P receptor regulation could be observed *in vivo* on skin DC after their activation and migration into the lymph node. The migration-inducing effect of S1P could be severely hampered by application of the S1P analogon FTY720 *in vitro* and *in vivo*. A similar, yet more pronounced, block was observed upon preventing Cdc42/Rac and/or Rho activation by specific inhibitors. These results suggest that S1P-mediated signaling plays a pivotal role in the life cycle of DC. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 2960–2967.

Dendritic cells (DC)³ represent the most important class of APCs in the immune system, holding a key position in instructing adaptive immune responses or tolerance induction (1). Immature DC are present in nearly any tissue, where they continuously collect and process Ag. At a low, but constant, rate, these DC migrate to their corresponding draining lymph node (LN) to maintain peripheral tolerance by anergizing matching T cells (2). However, Ag uptake coupled to DC stimulation via danger signals will trigger their maturation and enhanced migration to the LN, wherein T cells will be activated to initiate adaptive immune responses. The transition from an immature to a mature DC is accompanied by up-regulation of activation markers such as CD40, CD83, and CD86. Commencing CCR7 expression allows the maturing DC to direct migration to the LN (3, 4), whereas up-regulation of MHC class II (MHCII) expression ensures efficient Ag presentation to T cells inside the LN. The maturation of DC is inevitably correlated with huge phenotypic changes. Thus, an immature DC residing in tissue such as skin is sessile and possesses multiple dendrites, enabling efficient Ag uptake. Upon triggering migration to the LN, the DC retract dendrites and become highly motile. Once inside the LN, DC rebuild dendrites and lose motility again (5, 6). Little is known about the mechanisms controlling these transitions. However, it was demonstrated that the small GTPases, Cdc42, Rac, and Rho, account for related pheno-

typic changes in various immune cells by manipulating actin skeleton reorganization (7–12).

Sphingosine-1-phosphate (S1P), a metabolite produced by many cell types, such as platelets, and present in high concentrations in serum (up to 1 μ M), is increasingly recognized as a potent lipid mediator important in various physiological processes (13, 14). In the immune system, S1P was shown to possess chemoattractive properties on several cell types (15–18). S1P regulates the egress of B and T cells from LN, constituting one of the check points controlling lymphocyte homeostasis (18). In addition to this, S1P is required for correct positioning of marginal zone B cells inside the spleen (15). S1P exerts most of its effects by binding to five related G protein-coupled receptors, termed S1P₁₋₅, possessing distinct expression profiles and affinities toward S1P (19, 20). Interestingly, the five S1P receptors differ in their downstream effects (21, 22). Although S1P₁ predominantly activates the Rac/Cdc42 pathway, thereby sustaining cell migration, S1P₂ has been shown to inhibit locomotion via Rho activation. The range of S1P₁ and S1P₂ is extended by S1P₃, affecting Rac as well as Rho activity (23–26). The compound FTY720 represents an S1P analogon binding to four of the five S1P receptors, thereby diverting S1P signaling (19, 20). When administered *in vivo*, the immunomodulator FTY720 inhibits egress of lymphocytes from secondary lymphoid organs and, thus, recirculation of cells to peripheral inflammatory tissue. Therefore, the resulting lymphopenia substantially impairs immune responses, and FTY720 was assigned considerable potential as a therapeutic tool in organ transplantation (27, 28).

In vitro studies mimicking DC differentiation greatly facilitated elucidation of the steps in the DC maturation program (1). We studied the influence of S1P and its analogon FTY720 on DC migration using *in vitro* differentiated murine DC. Our results demonstrate that mature, but not immature, DC migrated to S1P. Inhibitors specifically preventing either Rac/Cdc42 or Rho activation hampered migration to a substantial degree, whereas blocking both types of small GTPases resulted in a complete failure to migrate to S1P. FTY720 did not trigger DC migration per se. Preincubation of mature DC compromised, yet did not abolish, their S1P-induced migration. *In vitro* as well as *in vivo* DC maturation/

*Institute of Immunology and †Institute of Toxicology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Received for publication December 23, 2004. Accepted for publication June 7, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant SFB566-A14, in part by Grant SFB587-B3 (to R.F.), and in part by Grant SFB621-B5.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Reinhold Förster, Institute of Immunology, Hannover Medical School, Carl Neuberg Strasse 1, 30625 Hannover, Germany. E-mail address: foerster.reinhold@mh-hannover.de

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; DAPI, 4',6-diamido-2-phenylindole hydrochloride; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; LN, lymph node; MHCII, MHC class II; S1P, sphingosine-1-phosphate.

migration correlated with a profound up-regulation of S1P₁ and S1P₃ expression. FTY720 interfered with DC migration to the LN after FITC painting, suggesting that part of the immune modulation accomplished by FTY720 may be caused by impaired DC migration.

Materials and Methods

Reagents

FTY720 was a gift from Volker Brinkmann (Novartis). S1P was purchased from Sigma-Aldrich. Chemokines were purchased from R&D Systems.

FACS analysis

Cells were analyzed on a FACSCalibur (BD Biosciences) after having been stained with the following mAbs: FITC-labeled anti-CD11c, biotinylated anti-MHCII (1Ab, 1Ad; BD Biosciences); PE-labeled anti-CD86 (Immunotech); and anti-CD207 mAb clone 929F3 (provided by S. Saeland, Schering-Plough, Dardilly, France). As secondary reagents, Cy5-labeled mouse anti-rat, Cy5-labeled goat anti-human IgG (Dianova), and PerCP-labeled streptavidin (BD Pharmingen) were used. CCR7 staining was performed using an ELC-human IgG1 fusion protein (provided by S. Krautwald, University of Kiel, Kiel, Germany). Cell sorting was performed on a FACSria (BD Biosciences).

Expression and purification of the cell-accessible C3-fusion toxin

Exoenzyme C3 from *Clostridium botulinum* was administered to mature DCs using the *C. botulinum* C2 toxin as a delivery system (29). In brief, GST fusion proteins were expressed by *Escherichia coli* harboring plasmid pGEX2T-C2II or pGEX2T-C2I¹⁻²²⁵-C3 and precipitated from the cell lysate using a 50% slurry of glutathione-Sepharose 4B in PBS. C2I¹⁻²²⁵-C3 was liberated from the agarose matrix by treatment with thrombin at room temperature for 1 h (3.25 National Institutes of Health units/ml bead suspension). GST-C2II was activated by treatment with trypsin at room temperature for 20 min. Trypsin was then inactivated by addition of trypsin inhibitor.

Purification of *C. difficile* toxin B (toxin B) and *C. sordellii* lethal toxin (lethal toxin)

Toxin B and lethal toxin were purified from culture supernatants of *C. difficile* strain VPI 10463 or *C. sordellii* strain 6018, respectively (30). In brief, a dialysis bag containing 900 ml of 0.9% NaCl in a total volume of 4 l brain heart infusion (Difco) was inoculated with 100 ml of an overnight culture of *C. difficile* or *C. sordellii* and grown under microaerophilic conditions at 37°C for 72 h. Proteins were precipitated from the culture supernatant by ammonium sulfate at 70% saturation. The precipitates were dialyzed against Tris-HCl, pH 7.5, buffer overnight and loaded onto a MonoQ columns (Amersham Biosciences). The toxins were subsequently eluted with Tris-HCl, pH 7.5, buffer containing 500 mM NaCl.

Treatment of cells with toxins

Cells were incubated with C3 fusion toxin (a mixture of 2.5 μg/ml qjC2I¹⁻²²⁵-C3 and 10 μg/ml C2IIa), toxin B (100 pM), lethal toxin (300 ng/ml), or pertussis toxin (100 ng/ml; Sigma-Aldrich) at 37°C overnight.

Mice

Eight- to 12-wk-old BALB/c and C57/BL6 mice were purchased from Charles River. CCR7-deficient mice (3) were backcrossed for seven generations to a C57BL/6 background and kept under specific pathogen-free conditions. Animal care and experiments were conducted in compliance with institutional guidelines and the German law for welfare of animals.

In vitro differentiation of DC

DC were prepared according to a modified protocol described by Lutz et al. (31). In brief, 2 × 10⁶ bone marrow cells from tibia and femur of C57/BL6 mice were cultured in RPMI 1640, 10% FCS, β-ME, glutamine, and penicillin/streptomycin supplemented with 100–200 ng/ml GM-CSF produced by a recombinant cell line (4) for 7 or 8 days. Cells were matured for 2 additional days with 1 μg/ml PGE₂ (Sigma-Aldrich) and 30 ng/ml TNF-α (PeproTech).

FITC skin painting

BALB/c mice were kept for 4 days with a water supply containing 3.5 μg of FTY720/ml. The mice were then anesthetized, and the outer skin of the

ears was painted twice with 0.1% FITC in acetone/dibutylphthalate (1/1) or vehicle alone (Sigma-Aldrich). After 24 h the mice were killed; the draining (facial) LN were collected, and single-cell suspensions were prepared. The proportions of cells positive for CD11c, MHCII (1Ad), langerin (CD207), and FITC were analyzed by flow cytometry.

Migration assays

Most migration assays were conducted using a 48-well Boyden chamber and polycarbonate membranes possessing 5 μm pores (NeuroProbe). The membranes were coated with 20 μg/ml murine collagen IV (BD Biosciences) in PBS overnight. Migration experiments were performed for 75–90 min, applying 1–2 × 10⁵ cells in RPMI 1640/20 mM HEPES, pH 7.4, in the upper well and the corresponding chemoattractant, as indicated, in the lower well. After completion, membranes were removed, wiped on the side facing the upper well, and stained with DiffQuick (Dade Behring). Membranes were then scanned, and the colorimetric densities of the spots were determined using the Genetools software package from Syngene (VWR International). Colorimetric densities of spots corresponding to wells with no chemoattractant added were defined as a migration index of 1. Transwell migrations were performed with 3 × 10⁵ cells/well for 2.5–3 h using the medium described above, applying collagen IV-coated Transwell inserts equipped with 5-μm pores (Corning).

RNA preparation and RT-PCR

Total RNA was prepared using the TRIzol method (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. RNA was reverse transcribed (SuperScript II reverse transcriptase; Invitrogen Life Technologies) using random hexamer primers. PCR was performed using Takara *Taq* (Takara Bio) polymerase/buffer system and the following primers. S1P1 sense, 5'-tct ctga cta tgg gaa cta tg-3'; S1P1 antisense, 5'-cca gga tga ggg aga tga c-3'; S1P2 sense, 5'-cct taa ctc act gct caa tcc-3'; S1P2-antisense, 5'-gct gga aga tag gac aga cac-3'; S1P3 sense, 5'-aca agg tcc ggg tgc tga g-3'; S1P3 antisense, 5'-gta atg ttc ccg gag agt gtc-3'; S1P4 sense, 5'-gct agt ccc att gtc cag tag-3'; S1P4 antisense, 5'-gga cca ggt act gat gtt cat g-3'; hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) sense, 5'-aag cca aat aca aag cct aag-3'; and HPRT antisense, 5'-tga aag tgg gaa aat aca gc-3'.

The expression of GAPDH, S1P1, S1P2, S1P3, and S1P4 was also analyzed using a LightCycler 2.0 (Roche) and the Fast Start DNA Master Plus SYBR Green Kit (Roche). Gene expression was standardized with serial dilutions of genomic DNA with calculated copy numbers, except for S1P3. Because the primer detecting this gene product encompasses two exons, genomic DNA could not be used as a template. Therefore, the S1P3 PCR product was purified, and the DNA concentration was quantified with the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (PegLab). Copy numbers were calculated, and a standard curve was computed. The relative gene expression (fold of GAPDH) of each gene was calculated by dividing copy numbers of the appropriate gene by copy numbers of GAPDH. Standard curves were derived analyzing triplicate determinations; samples were amplified in duplicate. The following primers were used (5'→3'): GAPDH forward, TGCACCACCACTGCTTAG; GAPDH reverse, GGATGCAGGGATGATGTTTC; S1P1 forward, GGAGGTTAAAGCTCTCCGC; S1P1 reverse, CGCCCCGATGTTCAAC; S1P2 forward, GTGACGGGACGCA GAGGT; S1P2 reverse, AAATGTCGGTGATGTAGGCATATG; S1P3 forward, GGAGCCCCTAGACGGGAGT; S1P3 reverse, CCGACT GCGGGAAGAGTGT; S1P4 forward, CCACAGCCTCCTCATTGTC; and S1P4 reverse, TCAGCATCCCTAGCCCTC.

Isolation of DC from skin and LN

Ears of C57/BL6 mice were split into halves and incubated for 1 h at 4°C in PBS containing 20 mM EDTA. After washing with PBS/3% FCS, the skin was cut into small pieces and digested at 37°C for 1 h with 1 mg/ml collagenase/dispase (Roche) in RPMI 1640/10% FCS containing 20 mM HEPES according to the manufacturer's protocol. Skin pieces and cell suspension were processed through a cell strainer (BD Biosciences) and washed with PBS/3% FCS. The resulting cell suspension was stained with mAbs to CD11c, MHCII, CD80 (all from BD Biosciences), B220 (clone TIB146), and 4',6-diamido-2-phenylindole hydrochloride (DAPI) nuclear dye. CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺B220⁻DAPI⁻ cells were sorted twice using a FACS-Aria (BD Biosciences). This resulted in population purities of ≥98%. The draining LN of FITC skin-painted mice were isolated 24 h after painting, cut into pieces, and digested at 37°C for 30–45 min with 0.5 mg/ml collagenase A and 50 U/ml DNase I in RPMI 1640/HEPES/10% FCS (Roche). A single-cell suspension was prepared, and the cells were stained with mAb against CD11c and MHCII. CD11c⁺MHCII^{high}FITC⁺DAPI⁻ DC were sorted as described above for skin DC. After sorting, cells were lysed,

and RNA was prepared using the Stratagene RNA Microprep kit. RNA integrity was analyzed applying an Agilent bioanalyzer.

Results

In vitro-generated mature DC migrate toward S1P

We generated murine DC by cultivating bone marrow cells in the presence of GM-CSF. Unstimulated immature DC on day 7 of culture and matured DC after 2 days of permanent treatment with TNF- α /PGE₂ were used in Transwell as well as Boyden chamber experiments to analyze their migration to S1P. Mature DC were discriminated from immature DC by virtue of their expression profile (immature, CCR7⁻MHCII⁻CD86^{low}; mature, CCR7⁺MHCII^{high}CD86^{high}; data not shown). In contrast to human DC, the established protocols used to generate bone marrow-derived murine DC tend to yield less homogeneous populations of immature vs mature DC. Thus, the fraction of cells with a mature phenotype varied between 50 and 70% after TNF- α /PGE₂-induced differentiation. Similarly, the culture of immature DC on day 7 contained 5–15% of cells with a mature phenotype, probably due to spontaneous maturation caused by endogenous production of TNF- α . As shown in Fig. 1A (dashed line), a mature population used in the migration assays contained phenotypically immature as well as mature cells, as evidenced by differential expression of CCR7. Notably, transmigrated cells were exclusively recruited from the mature fraction (CCR7⁺) of loaded cells (Fig. 1A, solid line). Their mature phenotype was confirmed when analyzing CD86 or MHCII expression (data not shown). The maximal migration caused by S1P in our experimental setup is comparable to that elicited by 5–10 nM CCL21 (Figs. 1B and 2C), a ligand for CCR7 known as a very effective chemoattractant for mature DC (32). Our observations were corroborated by applying a range of S1P concentrations in the assays. Although mature DC displayed a concentration-dependent optimum of migration (500–1000 nM; Fig. 1B and data not shown), immature DC remained unresponsive to S1P over the entire concentration range (Fig. 1B). Immature DC did not lack inherently any migratory potential, because they were efficiently attracted by the CCR5 ligand CCL3 (Fig. 1B). The migration of mature DC to S1P was found to be independent of CCR7, because DC matured from CCR7 knockout mice possess a similar migration pattern toward S1P as wild-type cells (data not shown).

DC migration toward S1P is hampered by FTY720

The immunomodulating effects of FTY720 are most likely caused by the sequestration of lymphocytes into secondary lymphoid organs, thereby withdrawing immune surveillance from the periph-

ery (33). Available evidence suggests that FTY720 binding triggers internalization of S1P₁ (18, 34, 35), evoking a strikingly diminished responsiveness of this receptor to its natural ligand S1P. Therefore, we studied the effects of this drug on DC migration. Over the range of concentrations investigated, mature DC remained refractory to migration to FTY720 (Fig. 1B). Intriguingly, preincubation of the cells overnight with increasing concentrations of FTY720 led to a concomitant decrease in migration toward S1P up to 60% compared with untreated DC (Fig. 2A). However, the cells did not become totally ignorant of S1P. Instead, FTY720 incubation caused a shift in the response curve toward higher concentrations of S1P. Dose-response profiles of untreated or FTY720-treated mature DC ran into identical saturation plateaus at S1P concentrations beyond 2 μ M (Fig. 2B), yet the loss of sensitivity to S1P seemed most pronounced at those concentrations of S1P reported to be physiologically relevant. It has been suggested that FTY720 might induce apoptosis of the treated cells (36), explaining its immunomodulating effects. However, induction of apoptosis seems to require unphysiologically high concentrations of FTY720. We examined the viability of cells incubated in the presence of FTY720 by propidium iodide uptake or trypan blue staining. Noticeable differences between treated (up to 2 μ M FTY720) and untreated DC were never observed by these criteria, indicating an absence of enhanced cell death or late phase apoptosis (data not shown). This idea was also supported by the finding that FTY720 did not reduce migration to the chemokine CCL21 (Fig. 2C). Furthermore, FTY720 administration exerted no influence on the expression level of DC markers such as CD11c, CD86, MHCII, or CCR7 (data not shown). These data suggest that FTY720 treatment did not generally inhibit migration or maturation of DC; instead, it induced an alteration in sensitivity to S1P. Therefore, our findings support the hypothesis that FTY720 acts through specific internalization of S1P receptors, rendering the cells less responsive to an S1P signal (18, 34).

Influence of FTY720 on DC migration in vivo

To test whether FTY720 shows an effect on in vivo migration of DC, we conducted FITC skin-painting experiments with untreated BALB/c mice and animals that received FTY720 for 4 days. In these experiments, the ears of the mice were painted with an organic solvent containing FITC. Those DC residing in the dermis and epidermis taking up the stain were induced to mature. The migration of DC was monitored 24 and 48 h later by analyzing the draining LN. Immigrated DC were traced as side scatter^{high} and FITC⁺ cells (Fig. 3, A and B) and were analyzed for expression of additional surface markers. Regardless of FTY720 treatment, all

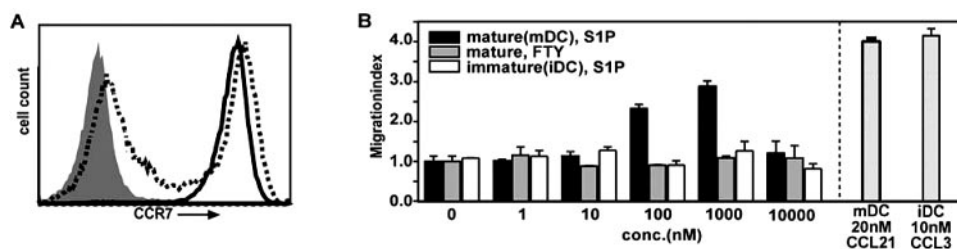


FIGURE 1. Migratory responses of in vitro-derived DC to S1P and FTY720. Bone marrow-derived DC were differentiated in the presence of GM-CSF for 7 days (immature DC) and induced to mature for 2 additional days by adding a mixture of TNF- α /PGE₂ (mature DC). A, Mature CCR7⁺ cells migrate to S1P. In vitro-generated DC induced to mature for 2 days (day 9; dashed line), containing both phenotypically mature (CCR7⁺) and immature (CCR7⁻) DC, were subjected to Transwell migration toward 500 nM S1P. Reanalysis of the transmigrated cells (solid line) revealed their mature phenotype (CCR7⁺). The isotype control of the cells used for migration is shown as a shaded area. B, Migration assays were performed in a Boyden chamber. Immature DC (□) were unresponsive to S1P over the tested range of concentrations, but migrated well to 10 nM CCL3 (▣). Mature DC migrated dose-dependently to S1P (■); in contrast, FTY720 itself did not evoke chemotaxis (▤). Migration of mature cells to 20 nM CCL21 is shown as a positive control (▥). Experiments were performed in duplicate, and one representative of at least three independent experiments is shown.

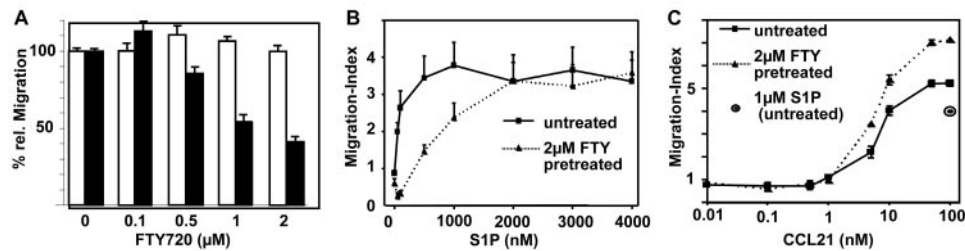


FIGURE 2. Influence of FTY720 on migratory responses of mature in vitro-generated DC. DC were generated and matured as described in Fig. 1 and used in Boyden chamber migration experiments. *A*, Mature DC were incubated overnight in the presence or the absence of distinct concentrations of FTY720. The subsequent migration toward 750 nM S1P (■) was found to be reduced dose-dependently down to 40% of the untreated control value, whereas the migration to 20 nM CCL21 (□) was slightly enhanced. *B*, Mature DC were incubated overnight with or without 2 μ M FTY720. Subsequently, their migration to various concentrations of S1P was analyzed. Concentrations of up to 2 μ M S1P, FTY720-treated cells (dotted line) were less sensitive to S1P than untreated cells (solid line). *C*, Untreated DC (solid line) or DC pretreated overnight with FTY720 (dashed line) were used in migration assays toward CCL21. Migration of untreated cells toward 1 μ M S1P was included as a control (encircled asterisk). Experiments were performed at least in duplicate. *A* and *B*, Pooled data from three independent experiments are shown. *C*, One representative experiment of three independent experiments is shown.

FITC⁺ DC were distinguished by high expression levels of MHCII and were positive for CD11c (Fig. 3*D*). A minority of these cells coexpressed CD207 (langerin), which classified them as Langerhans cells (37) that emerged from the epidermis (Fig. 3*C*). Comparing the expression of costimulatory molecules on DC in skin draining lymph node 24 h after FITC painting, we identified recently immigrated, FITC-positive DC as fully matured because they are distinguished by high levels of CD80 and CD86. In contrast, FITC⁻ DC apparently possess a semimature phenotype expressing intermediate levels of CD40, CD80, and CD86 (Fig. 3*E*). The expression level of any of these markers on FITC⁻ or FITC⁺ DC remained unaffected by FTY720 treatment (data not shown).

In line with the in vitro data presented above, we observed that the number of cells that migrated into the LN was significantly reduced after FTY720 application (Fig. 3*F*; ~60% of the level found in untreated mice). This effect was even more pronounced after 48 h, because only 40% of the DC found in untreated mice reached the lymph node in mice treated with FTY720 (Fig. 3*F*; note the cumulative effect of time on DC number). Interestingly, the proportion of Langerhans cells in the migrated FITC⁺ DC population was not altered in the presence of this drug (untreated mice, 8.6 \pm 0.4%; FTY720-treated mice, 8.9 \pm 0.4%; mean \pm SEM; 10 lymph nodes/group).

FTY720 treatment might trigger an unspecific exodus of skin-resident DC, thereby diminishing the pool of migration-competent cells in the FITC skin-painting experiments. Therefore, the number of DC residing in the epidermis after FITC skin painting in wild-type mice and those fed with FTY720 for 4 days was analyzed by means of MHCII-positive cells. It was obvious that the number of epidermal DC in both groups remained unaltered. The mean number of DC settling the epidermis added up to ~870 cells/mm² (untreated, 872 \pm 113 (n = 11); treated, 869 \pm 91 (n = 9); mean \pm SEM) in both groups.

S1P receptor expression on in vitro differentiated DC

Although S1P also acts as a cell internal second messenger (38), most of its effects are transmitted via extracellular binding to S1P receptors formerly addressed as endothelial differentiation gene receptors. Hence, the expression profile of S1P receptors was determined in immature as well as mature DC. Because Abs that can detect the single S1P receptor are not available, we first established a semiquantitative PCR to study the expression of S1P₁₋₅. RNA was prepared from FACS-sorted, in vitro-generated DC populations. Unstimulated immature DC on day 7 of culture were stained for CD11c, MHCII, and CCR7, and then sorted. Immature cells

that expressed CD11c, but no CCR7, and low to intermediate levels of MHCII were collected (purity of fraction, >95%). Mature DC were sorted on day 9 of culture after stimulation with TNF- α /PGE₂ on day 7. More than 90% of the sorted cells were CD11c⁺, MHC II^{high}, and CCR7⁺. The PCR products shown in Fig. 4 reflect the relative expression levels of each S1P receptor obtained with serially diluted cDNA templates representing either immature or mature DC. To ensure that roughly equal amounts of RNA-derived template DNA were used, the transcript of the murine HPRT gene was titrated simultaneously. Most strikingly, an S1P₁-specific transcript was undetectable in immature DC at the given experimental conditions, whereas its induction in mature DC gave rise to a readily visible PCR product. Both immature and mature DC express S1P₂, S1P₃, and S1P₄, whereas S1P₅ could not be detected in any case (data not shown). S1P₂ and S1P₄ appeared unaltered or slightly down-regulated due to maturation. S1P₃, already expressed in immature cells at detectable levels, was observed to be substantially up-regulated upon maturation. Given that S1P₂ and S1P₄ mRNA levels remained almost unaffected by maturation, S1P₃ and particularly S1P₁ expression on mature DC seemed to enable in vitro migration of mature DC toward S1P.

Induction of S1P₁ after activation of skin DC in vivo

To further investigate the importance of S1P signaling for DC migration and maturation in vivo, we compared the expression of S1P receptors 1, 2, 3, and 4 of DC isolated from untreated skin and of FITC⁺ LN DCs isolated 24 h after FITC skin painting. Skin DC (CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺B220⁻) and LN DC (FITC⁺MHCII^{high}CD11c⁺) were sorted twice by flow cytometry to obtain pools of >98% homogeneity (Fig. 5*A* and data not shown). mRNA expression of the S1P receptors of the given DC populations was analyzed by quantitative RT-PCR and referred to that of GAPDH. Compared with GAPDH, we found weak to moderate expression of all receptors on DC isolated from skin. In contrast, once migrated to the draining LN, S1P₁ expression was massively induced in the DC (~38-fold), whereas a slight up-regulation (2.4-fold) was observed for S1P₃. In contrast, the expression of S1P₂ and S1P₄ remained at a constant level. Taken together, these data correspond strikingly to the findings obtained for in vitro differentiated DC (see Fig. 4) and indicate that S1P₁ along with S1P₃ play important roles in the migration of DC from the periphery to lymphoid organs.

Influence of toxins on DC migration

To gain further insight into the signal transduction caused by S1P receptor engagement, we tested several specific inhibitors of cell internal signal transduction molecules for their influence in migration assays. Migration to the CXCR4 ligand CXCL12 was included in the assays as a control, because it is known that CXCL12 represents a potent chemoattractant for mature DC (32).

Preincubation of mature DC with pertussis toxin, a selective inhibitor of the heterotrimeric G protein $G_{\alpha i}$, resulted in complete

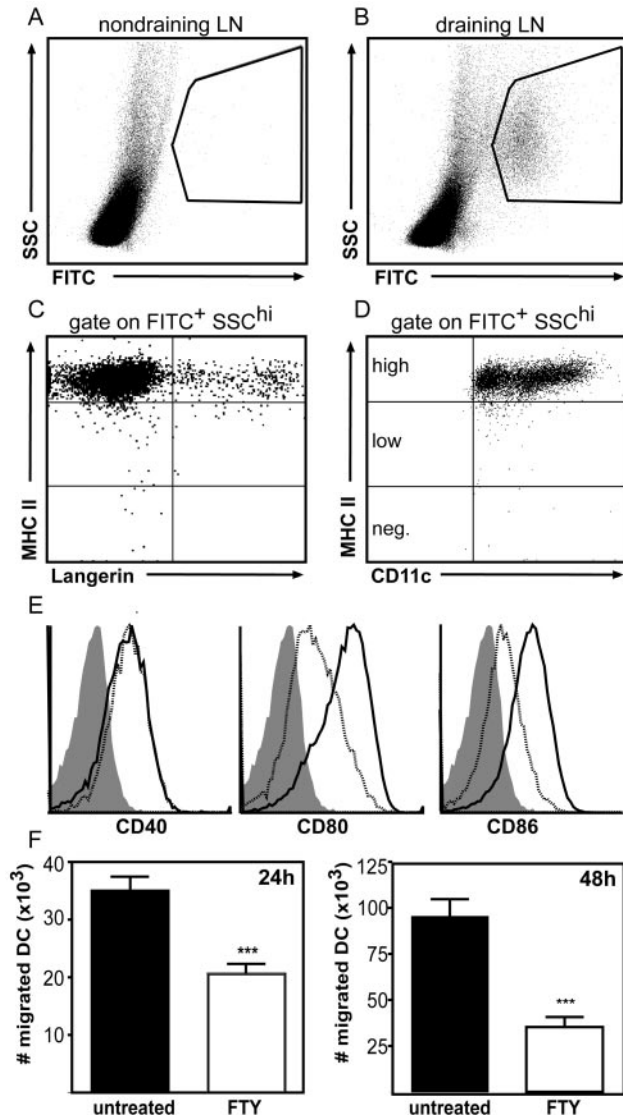


FIGURE 3. Influence of FTY720 on in vivo migration of DC in FITC skin-painting experiments. BALB/c mice were painted at the outer side of the ears with 0.1% FITC in dibutylphthalate/acetone. Twenty-four hours later the draining (facial) LN was analyzed. Migrated DC appear as side scatter^{high}FITC⁺ cells in the draining (B), but not in non-draining, inguinal LN (A). A small proportion of the FITC⁺ DC are Langerhans cells, as evidenced by the coexpression of MHCII and Langerin/CD207 (C), whereas all migrated cells show expression of MHCII and CD11c (D). E, Expression of CD40, CD80, and CD86 on immigrated FITC⁺ DC (solid line) and resident FITC⁻ DC (dashed line) from draining LN of FTY720-treated, skin-painted animals. F, Number of FITC⁺ DC isolated from the draining LN 24 and 48 h after FITC skin painting of untreated animals (■) or of animals treated with FTY720 (□; data from two or three independent experiments with eight to 15 animals/group for each time point; mean ± SEM). ***, $p < 0.0001$.

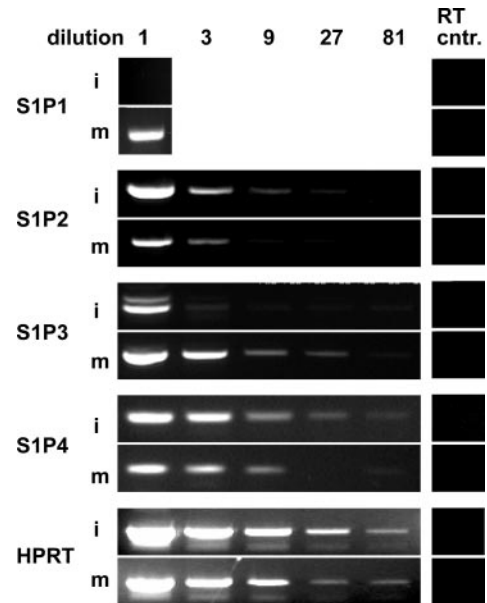


FIGURE 4. Expression of S1P receptors and HPRT in immature and mature in vitro-generated DC. RNA was prepared from in vitro-differentiated, bone marrow-derived, FACS-sorted immature DC (i; CD11c⁺MHCII^{low}CCR7⁻) and mature DC (m; CD11c⁺MHCII^{high}CCR7⁺) and reverse transcribed. The cDNA was used for RT-PCR in 3-fold serial dilutions. In the RT controls, undiluted mock cDNA templates derived from parallel RT reactions lacking reverse transcriptase were used.

abrogation of migration to S1P and CXCL12 (see Table I), demonstrating that both agents signal via $G_{\alpha i}$ to initiate migration. The small GTPases of the Rho family, Rac, Cdc42, and Rho, integrate upstream signals, converting them into cytoskeleton remodeling activity, which, in turn, regulates dynamic cellular processes such as motility, morphology, and endocytosis (7, 39). Incubation of mature DC with *Clostridium difficile* toxin B (toxin B), which inhibits Cdc42, Rac, and Rho (40), entirely blocked responses to CXCL12 and S1P, confirming that migration depends on integral signal transmission by small GTPases. Exoenzyme C3 from *C. botulinum* (C3 exoenzyme) specifically ADP-ribosylates RhoA/B/C (40) and was found to hamper the migration toward S1P and CXCL12 significantly (>80%). A comparable effect was observed when cells were treated with *Clostridium sordellii* lethal toxin (lethal toxin), which prevents activation of Rac and Cdc42, but not that of Rho (41). These results indicate that the migration of mature DC is crucially dependent on 1) intact $G_{\alpha i}$ signaling and 2) the simultaneous activity of both types of GTPases, Rac/Cdc42 and Rho, respectively.

Discussion

Recent observations suggested that the lipid mediator S1P is critically involved in trafficking of immune cells (15, 18). Lymphocyte homeostasis is continuously maintained to warrant quick responses of the immune system to both potentially harmful and innocuous Ags. This circuit is interrupted by the action of the semi-synthetic compound FTY720 interfering with proper signaling via S1P (19, 34). As a consequence, regular adaptive immune reactions are compromised (42, 43). This immunomodulating trait of FTY720 is currently exploited therapeutically in trials to enhance survival of incompletely MHC-matched organ grafts (44). Induction of adaptive immunity is crucially dependent on proper presentation of Ag to T cells. Among the family of APCs, DC are of primordial interest due to their exquisite efficacy in Ag sampling

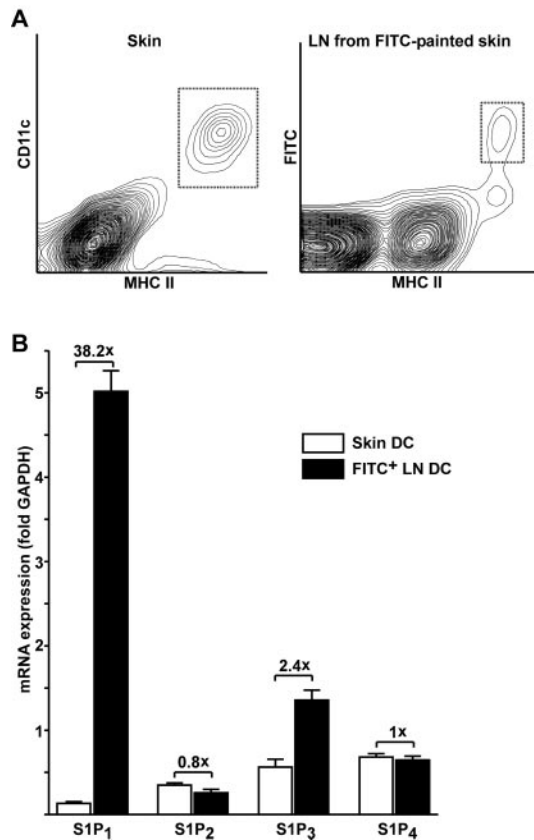


FIGURE 5. Expression of S1P receptors in resident skin DC and FITC⁺ LN DC after FITC skin painting. *A*, DC were isolated from untreated skin or from the draining LN 24 h after FITC skin painting. According to the gates depicted as dotted lines, CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺B220⁻ skin DC or FITC⁺CD11c⁺MHCII^{high} DC from the draining LN were FACS sorted, and RNA was prepared. *B*, Expression of S1P receptors in sorted resident skin DC and FITC⁺ DC immigrated into the draining LN. The relative mRNA expression of S1P receptors 1–4 are shown referred to GAPDH expression. □, mRNA expression in resident skin DC; ■, expression in FITC⁺ skin-derived DC in the draining LN. Numbers above bars represent the fold induction of gene expression between the two DC populations (mean ± SEM). Two independent experiments with duplicate determinations were performed; in both experiments, DC were pooled from four to eight animals per group.

and presentation. Like lymphocytes, DC are required to travel to accomplish their mission. For these reasons, we intended to elucidate in more detail the effects of S1P and its analogon FTY720 on DC traffic in vitro and in vivo. Furthermore, we investigated the expression of the known S1P receptors and the anticipated involvement of intracellular mediators of S1P signaling in DC migration. In assays performed with in vitro differentiated murine DC, we found that mature cells migrated to S1P, whereas immature DC remained unresponsive over a wide range of S1P (Fig. 1, *A* and *B*). These observations are in conflict with those reported by Renkl et al. (45), suggesting that both immature as well as mature murine DC are S1P responsive. The causes of this discrepancy may be ascribed to the mixed composition of in vitro-generated immature/mature DC populations if used as a whole in the migration assays. Interestingly, human blood monocyte-derived DC migrate to S1P only in the immature state, whereas mature cells lose this ability (46). It remains an unresolved issue at present whether this suggests an inborn divergence between mouse and human DC or simply reflects the different source of progenitor cells (bone

marrow in mouse vs blood in human) and/or variations in the differentiation protocols in use.

In contrast to S1P, FTY720 failed to induce migration of mature murine DC (Fig. 1*B*). Remarkably, pretreatment of mature DC with this drug dose-dependently impaired migration to S1P, but not to CCL21 (Fig. 2*A*). An efficient block of DC migration provoked by FTY720 pretreatment apparently requires relatively high concentrations of the drug. Therefore, it was critical to validate this effect in vivo by investigating FITC-induced migration of skin DC to the draining LN. As in the in vitro setting, a substantial, yet incomplete, block of migration was observed (Fig. 3*F*). Considering the key position taken by DC in inducing immune responses, this finding would suggest that the immunomodulating effects of FTY720 may in part be caused by impairing proper T cell priming in the secondary lymphoid organs. However, this observation may also be taken into account when evaluating side effects of therapeutic long-term FTY720 treatments because of their potentially harmful influence on maintaining peripheral tolerance. Yet a drastic failure of DC-based immune functions seems unlikely, because S1P-mediated migration is not revoked, but is rendered less sensitive (Fig. 2*B*). In addition, migrations controlled by chemokines remained unaffected (Fig. 2*A* and data not shown).

The most striking differences in S1P receptor expression linked to DC maturation in vitro and in vivo relate to the up-regulation of S1P₁ and S1P₃. As a consequence, cells obviously acquire the capability to migrate to S1P. Alternatively, general cellular predispositions for migration may be given only in mature cells. However, immature DC were found to migrate well to CCL3. Our observations are in line with other reports exploring S1P receptor function in migration; the prevalence of S1P₁- and S1P₃-mediated signaling promoted migration, whereas that of S1P₂ antagonized it (see review by Sanchez and Hla (21)). Tracking the signaling paths used by S1P receptors, evidence accumulated that signals relevant for migration are transmitted via the heterotrimeric G protein G_{αi} to Cdc42 and Rac (23, 25, 26). At the level of small GTPases, a predominating Cdc42/Rac activation favors migration, whereas constantly active Rho results in arrest. This is substantiated by the finding that Rac-deficient mature murine DC are neither motile nor able to migrate into LN (47). Migration is a complex cellular process requiring the integration of diverse counteracting events, each for itself paradigmatic for a sessile (e.g., formation of cell/cell or cell/matrix contacts) or a motile phenotype (e.g., assembly of lamellipodia and filopodia). Dissected in consecutive steps such as attachment, moving the cell body, and detachment, it is conceivable to assume that migration requires both signals conducted by Cdc42/Rac and Rho. This is reflected by our finding that inhibitors for both pathways are effective in hampering DC migration. Such a scenario also explains the necessity for the presence of different S1P receptors on the cell surface. Even though Rac/Cdc42 signaling will prevail during initial activation of a DC due to up-regulation of S1P₁ and in part by S1P₃, an ongoing Rho activity transmitted by S1P₂ and probably S1P₃ remains a prerequisite for

Table I. Influence of toxins on the migration of mature DC^a

Percent Inhibition	PTX	Toxin B	C3-Fusion Toxin	Lethal Toxin
S1P	98 ± 1.8	97 ± 0.2	84 ± 5.6	80 ± 6.7
CXCL12	94 ± 6.6	96 ± 0.4	80 ± 1.5	87 ± 6.8

^a Mature DC were used in Transwell migrations to 750 nM S1P or 20 nM CXCL12. Cells were incubated overnight with either 100 ng/ml PTX, 100 pM toxin B, C3 coenzyme (2.5 μg/ml fusion toxin C2IN-C3, 10 μg/ml binding component C2IIa), or 300 ng/ml lethal toxin. The degree of inhibition was calculated in relation to the migration of untreated cells. (Mean ± SD from two to three independent experiments).

migration. Studies investigating the dynamics in DC dendrite formation/retraction in human immature DC came to similar conclusions by claiming a sequential activity of Rac and Rho in these processes (12). Notably, the retraction of dendrites from surrounding keratinocytes in skin represents the first step in mobilizing a skin-resident DC destined to migrate to its draining LN (6). We hypothesize that S1P-mediated signaling is already effective at this early stage, where a shift in receptor expression occurs, resulting in changed intracellular Cdc42/Rac/Rho activities now favoring the motile over the sessile phenotype. This particular switch in the Cdc42/Rac/Rho activity profile might be prevented by FTY720, which is known to bind with high affinity to S1P₁ and S1P₃, leaving the Rho-coupled receptor S1P₂ untouched (19). Therefore, the correct counterbalance of Cdc42/Rac vs Rho activity is the most critical event in triggering DC migration. We tend to interpret S1P-induced motility as short pulsating, yet unidirectional, cell polarizations. In conjunction with incoming chemokine signals, the transient polarization is rendered stable, resulting in a directed locomotion toward and into lymphatic vessels. Activated skin DC deficient in CCR7 cannot migrate into the nearby lymphatics (4) even though S1P-induced migration was unaffected in our in vitro assays. Vice versa manipulation of the S1P signaling path by FTY720 pretreatment fully retains the capacity of DC to migrate toward chemokine stimuli, indicating that signalings through S1P and chemokines are independent from each other in this scenario. In contrast, both types of signals are required simultaneously for triggering migration of maturing DC into the draining LN.

All in all, our results unequivocally demonstrate that mature DC depend on proper S1P signaling for migration, as reflected by their ability to migrate to this lipid mediator. Migration can be severely inhibited by FTY720 pretreatment in vitro and in vivo. Even though the implications of this effect on DC-borne immune reactions remain to be elucidated, FTY720 seems to suppress Cdc42/Rac activation by blocking signaling via S1P₁ and S1P₃. Tuning an S1P signal is accomplished by the concerted activities of several S1P receptors, thereby explaining the existing variety of S1P receptors frequently expressed at the same time on the same cell. A switch of the S1P receptor expression profile, as demonstrated in this study for the transition from immature to mature DC, may then convert an incoming S1P signal to another direction.

Acknowledgments

We are indebted to V. Brinkmann for providing FTY720, and we thank Oliver Pabst for critically reading the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 582–590.
- Belz, G. T., W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2002. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol. Cell Biol.* 80: 463–468.
- Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23–33.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Forster. 2004. CCR7 Governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21: 279–288.
- Lindquist, R. L., G. Shakhar, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M. L. Dustin, and M. C. Nussenzweig. 2004. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat. Immunol.* 5: 1243–1250.
- Becker, Y. 2003. Immunological and regulatory functions of uninfected and virus infected immature and mature subtypes of dendritic cells: a review. *Virus Genes* 26: 119–130.
- Ridley, A. J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114: 2713–2722.
- Srinivasan, S., F. Wang, S. Glavas, A. Ott, F. Hofmann, K. Aktories, D. Kalman, and H. R. Bourne. 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J. Cell Biol.* 160: 375–385.
- Sun, C. X., G. P. Downey, F. Zhu, A. L. Koh, H. Thang, and M. Glogauer. 2004. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood* 104: 3758–3765.
- Swetman, C. A., Y. Leverrier, R. Garg, C. H. Gan, A. J. Ridley, D. R. Katz, and B. M. Chain. 2002. Extension, retraction and contraction in the formation of a dendritic cell dendrite: distinct roles for Rho GTPases. *Eur. J. Immunol.* 32: 2074–2083.
- Wells, C. M., M. Walmsley, S. Ooi, V. Tybulewicz, and A. J. Ridley. 2004. Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J. Cell Sci.* 117: 1259–1268.
- Burns, S., A. J. Thrasher, M. P. Blundell, L. Machesky, and G. E. Jones. 2001. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 98: 1142–1149.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 397–407.
- Ishii, I., N. Fukushima, X. Ye, and J. Chun. 2004. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 321–354.
- Cinamon, G., M. Matloubian, M. J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol.* 5: 713–720.
- Graeler, M., and E. J. Goetzl. 2002. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J.* 16: 1874–1878.
- Kveberg, L., Y. Bryceson, M. Inngjerdigen, B. Rolstad, and A. A. Maghazachi. 2002. Sphingosine 1 phosphate induces the chemotaxis of human natural killer cells: role for heterotrimeric G proteins and phosphoinositide 3 kinases. *Eur. J. Immunol.* 32: 1856–1864.
- Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427: 355–360.
- Brinkmann, V., M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, et al. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 21453–21457.
- Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G. J. Shei, D. Card, C. Keohane, et al. 2002. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296: 346–349.
- Sanchez, T., and T. Hla. 2004. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J. Cell Biochem.* 92: 913–922.
- Siehring, S., and D. R. Manning. 2002. Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1582: 94–99.
- Okamoto, H., N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu, and Y. Takuwa. 2000. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell Biol.* 20: 9247–9261.
- Arikawa, K., N. Takuwa, H. Yamaguchi, N. Sugimoto, J. Kitayama, H. Nagawa, K. Takehara, and Y. Takuwa. 2003. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor: requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J. Biol. Chem.* 278: 32841–32851.
- Paik, J. H., S. Chae, M. J. Lee, S. Thangada, and T. Hla. 2001. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of α , β ₃- and β ₁-containing integrins. *J. Biol. Chem.* 276: 11830–11837.
- Sugimoto, N., N. Takuwa, H. Okamoto, S. Sakurada, and Y. Takuwa. 2003. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G_{12/13}-Rho and G_i pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol. Cell Biol.* 23: 1534–1545.
- Suzuki, S., S. Enosawa, T. Kakefuda, T. Shinomiya, M. Amari, S. Naoe, Y. Hoshino, and K. Chiba. 1996. A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation* 61: 200–205.
- Kahan, B. D. 2001. FTY720: a new dimension in transplantation. *Transplant. Proc.* 33: 3081–3083.
- Barth, H., F. Hofmann, C. Olenik, I. Just, and K. Aktories. 1998. The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect. Immun.* 66: 1364–1369.
- von Eichel-Streiber, C., U. Harperath, D. Bosse, and U. Hadding. 1987. Purification of two high molecular weight toxins of *Clostridium difficile* which are antigenically related. *Microb. Pathog.* 2: 307–318.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223: 77–92.
- Vecchi, A., L. Massimiliano, S. Ramponi, W. Luini, S. Bernasconi, R. Bonecchi, P. Allavena, M. Parmentier, A. Mantovani, and S. Sozzani. 1999. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J. Leukocyte Biol.* 66: 489–494.
- Brinkmann, V., D. D. Pinschewer, L. Feng, and S. Chen. 2001. FTY720: altered lymphocyte traffic results in allograft protection. *Transplantation* 72: 764–769.

34. Graler, M. H., and E. J. Goetzl. 2004. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 18: 551–553.
35. Allende, M. L., J. L. Dreier, S. Mandala, and R. L. Proia. 2004. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, SIP1, on T-cells controls thymic emigration. *J. Biol. Chem.* 279: 15396–15401.
36. Sonoda, Y., D. Yamamoto, S. Sakurai, M. Hasegawa, E. Aizu-Yokota, T. Momoi, and T. Kasahara. 2001. FTY720, a novel immunosuppressive agent, induces apoptosis in human glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 282–288.
37. Valladeau, J., V. Clair-Moninot, C. Dezutter-Dambuyant, J. J. Pin, A. Kissenpfennig, M. G. Mattei, S. Ait-Yahia, E. E. Bates, B. Malissen, F. Koch, et al. 2002. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J. Immunol.* 168: 782–792.
38. Spiegel, S., and S. Milstien. 2000. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* 476: 55–57.
39. DeMali, K. A., and K. Burridge. 2003. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 116: 2389–2397.
40. Just, I., F. Hofmann, H. Genth, and R. Gerhard. 2001. Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 243–250.
41. Schirmer, J., and K. Aktories. 2004. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim. Biophys. Acta* 1673: 66–74.
42. Han, S., X. Zhang, G. Wang, H. Guan, G. Garcia, P. Li, L. Feng, and B. Zheng. 2004. FTY720 Suppresses humoral immunity by inhibiting germinal center reaction. *Blood* 104: 4129–4133.
43. Pinschewer, D. D., A. F. Ochsenbein, B. Odermatt, V. Brinkmann, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J. Immunol.* 164: 5761–5767.
44. Budde, K., R. L. Schmouder, R. Brunkhorst, B. Nashan, P. W. Lucker, T. Mayer, S. Choudhury, A. Skerjanec, G. Kraus, and H. H. Neumayer. 2002. First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 1073–1083.
45. Renkl, A., L. Berod, M. Mockenhaupt, M. Idzko, E. Panther, C. Termeer, P. Elsner, M. Huber, and J. Norgauer. 2004. Distinct effects of sphingosine-1-phosphate, lysophosphatidic acid and histamine in human and mouse dendritic cells. *Int. J. Mol. Med.* 13: 203–209.
46. Idzko, M., E. Panther, S. Corinti, A. Morelli, D. Ferrari, Y. Herouy, S. Dichmann, M. Mockenhaupt, P. Gebicke-Haerter, F. Di Virgilio, et al. 2002. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *FASEB J.* 16: 625–627.
47. Benvenuti, F., S. Hugues, M. Walmsley, S. Ruf, L. Fetler, M. Popoff, V. L. Tybulewicz, and S. Amigorena. 2004. Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* 305: 1150–1153.

Sphingosine-1-phosphate signalling regulates positioning of dendritic cells within the spleen

Niklas Czeloth¹, Angela Schippers², Werner Müller², Birgit Eilers¹, Günter Bernhardt¹, Reinhold Förster¹

A successful execution and balance of adaptive immune responses requires a controlled positioning and navigation of dendritic cells (DC) into and inside secondary lymphoid organs. Whereas mechanisms were identified governing the migration of DC from peripheral non-lymphoid organs into their draining lymph nodes, little is known about the molecular cues controlling the proper positioning of spleen or lymph node resident DC. Here, we show that the sphingosine-1 phosphate receptor 1 (S1P₁) influences the positioning of immature DC inside the murine spleen. Following treatment with FTY720 or SEW2871, drugs known to interfere with S1P₁ mediated signalling, the 33D1⁺ DC subpopulation homogeneously re-distributes from the bridging channels to the marginal zone. In contrast, the CD205⁺ DC subset remains associated with the T cell zone. Upon *in vivo* LPS treatment, the maturing DC assemble in the T cell zone. The LPS driven re-distribution occurs in the absence of CCR7 and cannot be prevented by FTY720, indicating that guiding mechanisms differ between immature and mature DC. Along with the observed DC subtype specific S1P receptor expression pattern as well as the profound up-regulation of S1P₁ and S1P₃ accompanying DC maturation, these results suggest a decisive contribution of S1P signalling to intra-splenic DC motility and migration.

Introduction

Dendritic cells (DC) possess unique properties that enable them to sample, process and present antigen and thus represent the immune system's most important antigen presenting cells (1). DC are important in instructing adaptive immune responses (2) as well as maintaining tolerance to self (3-5). Immature DC reside in nearby any peripheral tissue, where they constantly sample and process antigen. Microbial stimulation and inflammatory conditions causes these cells to mature and to migrate to draining lymphoid organs, where they interact with and stimulate antigen specific T cells (6). The process of maturation is accompanied by profound phenotypic and functional changes. In addition, the maturing DC substantially modify their chemokine receptor repertoire, enabling them to migrate towards chemokines expressed by lymphatic vessels and in the T cell areas of secondary lymphoid organs (7). CCR7 and its ligands CCL19 and CCL21 play an especially important role in directing DC towards secondary lymphoid organs (8, 9). Therefore, it is assumed that the same or similar chemokines account for the positioning and migration of spleen resident DC. Splenic DC appear phenotypically immature and are located in the T cell zone, the red pulp, the bridging channels and in the marginal zone surrounding the follicle (10, 11). The splenic DC can be divided into major subsets differing in function and anatomic localization. Both CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ DC are known to efficiently present extracellular antigen on MHC II and

induce CD4 T cell responses (12). In contrast, only CD8 α ⁺ DC have the unique capability to present exogenously acquired antigen in the context of MHC class I (cross-presentation). They are competent to cross-prime CD8 T cells and elicit anti viral responses (13). A large part of the splenic DC resides in the bridging channels near to the T cell zone (14) and minor numbers can be found in the marginal zone or the red pulp. All these DC are CD8 α ⁻ and coexpress the protein recognized by the monoclonal antibody 33D1 (14). 33D1 was recently shown to recognize the C-type lectin DCIR2 (14) which mediates antigen uptake and presentation on MHC II. In contrast, CD8 α ⁺ DC exclusively reside in the T cell zone and coexpress the marker CD205 (DEC205). Once activated by microbial stimuli, all DC rapidly migrate into the T cell zone and concomitantly acquire a more mature phenotype (15).

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a recently identified lipid mediator that controls egress of T and B cells from secondary lymphoid organs (16, 17). Most of its effects are caused by binding to one of the five known S1P specific receptors, named S1P₁₋₅. The S1P receptors belong to the family of G protein coupled receptors and exhibit different affinities to S1P as well as unique effector functions (18). Members of the S1P receptor family are expressed in virtually all tissues yet many of their biological functions have remained enigmatic thus far. S1P₁ is the best characterized receptor of this group.

¹ Institute of Immunology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany

² Department of Experimental Immunology, Helmholtz Centre for Infection Research, Imhoffstr. 7, 38124 Braunschweig, Germany

submitted to The Journal of Immunology, 2007

Corresponding author:

Prof. Reinhold Förster
Institute of Immunology
Hannover Medical School
Carl-Neuberg-Str.1
30625 Hannover
Phone: +49-511/532 9721
FAX: +49-511/532 9722
e-mail: Foerster.Reinhold@mh-hannover.de

Deficiency (receptor knockout) for S1P₁ leads to a strong lymphopenia by inhibiting the egress of lymphocytes from thymus and lymphoid organs (17). S1P receptor deficiency may also be mimicked by the administration of agents such as FTY720 and SEW2871 which specifically interfere with S1P receptor function. Available evidence suggests that FTY720 becomes phosphorylated *in vivo* and interrupts S1P signalling mediated by all S1P receptors except for S1P₂. Under FTY720 treatment, the block of lymphocyte egress is accompanied by their enhanced integrin-dependent adhesion to HEV (19). This may support lymphopenia by guiding peripheral lymphocytes into secondary lymphoid organs (19). These characteristics qualified FTY720 as immunosuppressive drug greatly facilitating transplant tolerance by silencing alloreactivity to grafted tissue (20). SEW2871 differs from FTY720 by blocking only S1P₁ activity, thus allowing to address the function(s) of this receptor more precisely. Just like FTY720, SEW2871 binding to S1P₁ *in vivo* resembles the phenotype of receptor deficiency with regard to lymphocyte trafficking. S1P₁ function has also been shown to be crucial for various other biological activities such as vascular development (21) and positioning of marginal zone B cells in the marginal zone (22). However, the role of S1P₁ for the migration of DC has not been studied extensively so far. We have previously shown that murine DC generated *in vitro* acquire the ability to migrate to S1P upon maturation (23). The general importance of a physiologically active S1P/S1P receptor system was affirmed *in vivo* by the finding that the migration of maturing DC from skin or lung to their corresponding draining lymph node could be inhibited by FTY720 treatment. Here, we show that the positioning of immature DC in the spleen is altered by the S1P₁ antagonism exerted by FTY720 or SEW2871. In contrast, the LPS induced assembly of matured DC in the T cell areas cannot be influenced by FTY720 treatment. The FTY720 triggered redistribution of immature DC as well as the migration of mature DC inside the spleen were also observed in CCR7 deficient mice. These data suggest that intra-splenic positioning of DC requires active S1P signalling and may operate unrestricted in the absence of CCR7 based pathways.

Materials and Methods

Reagents

FTY720 was a kind gift of Volker Brinkmann (Novartis AG, Basel, Switzerland). SEW2871 was purchased from Biomol (Hamburg, Germany), LPS was purchased from Sigma (Seelze, Germany).

FACS analysis and histology.

Cells were analysed on a FACSCalibur or LSR II (BD Biosciences) after staining with the following monoclonal antibodies (mAbs): APC-labelled anti-CD11c, biotinylated anti-MHC II (1A_b), biotinylated anti-ICAM-1 (CD54), purified anti-MadCAM-1 (clone Meca-367, BD Biosciences, Heidelberg, Germany), PE-labelled anti-CD86, PE-labelled anti-CD40 (Immunotech, Berlin, Germany), purified anti-CD11c (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), purified/biotinylated anti-dendritic cell 33D1 (eBioscience, San Diego, USA), purified anti DEC-205 (CD205, clone NLDC-145, produced in house), FITC-labelled anti- α_L integrin (CD11a), FITC-labelled anti- β_1

integrin (CD29), FITC-labelled anti- β_2 integrin (CD18) (Pharmingen, BDBiosciences), PE-labelled anti- $\alpha_4\beta_7$ integrin (Sigma). As secondary reagents Cy5-labelled mouse anti-rat, (Dianova, Hamburg, Germany), Cy3-labelled mouse anti rat, Cy3-labelled streptavidin (Jackson Immuno Research, New Market, UK), PerCP-labelled streptavidin (Pharmingen, BD Biosciences), Cy5-labelled streptavidin (Invitrogen), and AlexaFluor594-labelled goat anti-hamster IgG (Molecular Probes, Eugene, USA) were used. For some histological stainings the tyramide amplification system was used (Perkin Elmer, Boston, USA). Cell sorting was performed on a FACS Aria (BD Biosciences). Nuclei of cells were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid). Composite histology pictures were taken on an Axiovert200M (Zeiss) equipped with a motorized table and an Orca ER camera (Hamamatsu). Pictures were taken using the Axiovision Software (Zeiss) and subsequently brightness, contrast and gamma correction were adjusted using Adobe Photoshop. All composite pictures were taken at room temperature with a 10x magnification and a numerical aperture of 0.55. Histological samples were prepared on Histobond-coated microscopic slides from Marienfeld laboratory glassware (Lauda-Königshofen, Germany) and mounted with Mowiol (Polysciences, Eppelheim, Germany).

Mice

8 to 12 week old C57/BL6 mice were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany). CCR7 (9), ICAM-1 and MadCAM-1 deficient mice were backcrossed to a C57BL/6 background. MadCAM-1-deficient mice were generated by Werner Müller and will be described in detail elsewhere. ICAM-1/MadCAM-1 double deficient animals were on a mixed C57/BL6/SV129 background. Animals were kept under specified pathogen-free conditions. Animal care and experiments were done in compliance with institutional guidelines and the German law for Welfare of Laboratory Animals.

Animal treatment

Mice were treated orally (by gavage) with 40 μ g/mouse/day FTY720 in H₂O or with 400 μ g/mouse SEW2871 in PBS/10% Tween/10%DMSO/10%Ethanol at the indicated time points. To induce *in vivo* maturation of DC, mice were injected intraperitoneally with 50 μ g LPS (Serotype E55:B5) in PBS.

RNA preparation, reverse transcription, and PCR.

Total RNA was prepared using the Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. RNA was reverse transcribed (Superscript II reverse transcriptase, Invitrogen) using random hexamer-primers. The expression of GAPDH, S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ and S1P₅ was analyzed using a Lightcycler 2.0 (Roche) and the Fast Start DNA Master plus Sybr Green Kit (Roche) or the Sybr Premix Ex Taq Kit (Takara). The following primer pairs were used. S1P1-S: 5'-tct ctga cta tgg gaa cta tg-3' ; S1P1-AS: 5'-cca gga tga ggg aga tga c-3' ; S1P2-S: 5'-cct taa ctc act gct caa tcc-3' ; S1P2-AS: 5'-gct gga aga tag gac aga cag-3' ; S1P3-S: 5'-aca agg tcc ggg tgc tga g-3' ; S1P3-AS: 5'-gta atg ttc ccg gag agt gtc-3' ; S1P4-S: 5'-gct atg ccc att gtc cag tag-3' ; S1P4-AS: 5'-gga cca ggt act gat gtt cat g-3'. Standardization and absolute relative quantification of expression levels was previously described (23). Additionally the Mm_Edg8_1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen) was used to determine expression levels of S1P₅.

Results

We have previously demonstrated that DC generated *in vitro* from bone marrow express a distinct pattern of S1P receptors depending on their state of activation. Immature DC were found to express S1P_{2,3,4} but little to none S1P₁. Upon stimulation, these immature DC were induced to mature and concomitantly up-regulated expression of S1P₁ and S1P₃, whereas the levels of S1P₂ and S1P₄ remained unchanged (23). Remarkably, this switch in S1P receptor repertoire correlated with the capacity of the

matured cells to migrate *in vitro* in response to S1P whereas immature cells lack such activity. Moreover, immature/mature skin derived DC exert the same characteristic switch in their S1P receptor expression profile. Once more the up-regulation of S1P₁ and S1P₃ is associated with the migration of the maturing DC(23) into the draining lymph node.

In continuation of our earlier work, we were interested to study the impact of S1P receptors on DC biology *in vivo*. We focused on DC residing in secondary lymphoid tissue. Following FTY720 application, we monitored the localization of DC inside peripheral lymph nodes and the spleen by microscopic inspection of cryosections stained with CD11c, CD3, and MHCII (see Fig. 1 A, B and data not shown). No apparent changes in the DC distribution pattern in peripheral lymph nodes (pLN) were evident in mice treated with FTY720 even though subtle rearrangements of the DC might have escaped detection. In contrast, we noticed a conspicuous redistribution of CD11c⁺ positive cells inside the spleen of animals fed with FTY720 (Fig. 1A). The FTY720 borne redistribution comes into effect rather quickly since the ring shaped arrangement of CD11c⁺ cells is detectable 12 hrs after initial application of the drug. Moreover, this effect is reversible upon withdrawal of the drug (not shown). The rather rapid and reversible kinetics favour the idea that this intra-splenic relocalization of DC is caused by cells already residing in the spleen and not by newly immigrating cells differentiating into DC. Indeed, FTY720 treatment exerted no influence on the percentage of DC found in the spleen (Fig. 1C). It is remarkable that a pronounced effect of FTY720 was observed in spleen and not in pLN, considering the fact that pLN contain a more diverse array of DC sub-populations compared to spleen. Spleen diverges from pLN by possessing a distinct anatomical feature, the marginal zone (MZ) (24). The MZ represents an area surrounding the white pulp and is known to be the home of MZ B cells, a subpopulation of B cells largely found only in spleen (22). Moreover, the MZ overlaps in an asymmetric fashion with the so called bridging channels, a structure believed to allow the passage of lymphocytes coming from the red pulp on their travel to the pulp (25). By microscopic inspection it was already evident that a large part of the splenic DC aggregates in the bridging channels and relocates uniformly throughout the MZ under FTY720 regimen, thereby surrounding the follicle (Fig.1 A). The co-localization of these DC with ICAM-1 confirms their distribution to the MZ overlapping with the outer border of the MadCAM-1 positive marginal sinus (Fig. 1 B, D). At the same time, the clustering of the DC in the regions of the bridging channels disappeared under FTY720 influence.

Since FTY720 specifically affects S1P signalling (26), we subsequently analysed the pattern of S1P receptors expressed by splenic CD11c⁺/MHCII⁺ DC (Fig. 2). Similar to the results obtained for skin DC, we found a generally low level of expression in real time PCR

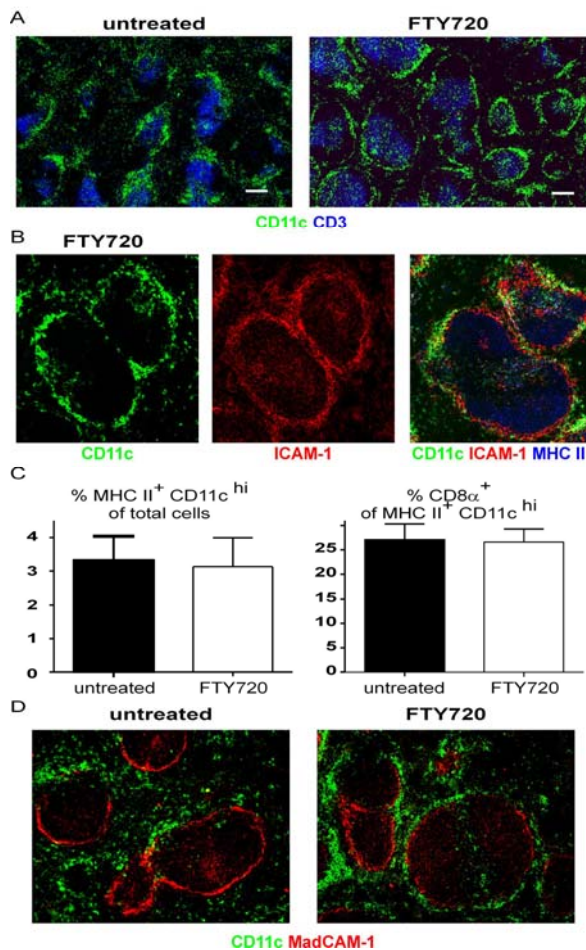


Figure 1. Displacement of splenic DC into the marginal zone after treatment with FTY720. Mice were treated or left untreated for 3 days with 40 μ g/day FTY720. A +B: Redistribution of DC in the spleen following FTY720 treatment. A: Composite pictures of splenic cryosections from untreated (untreated) or FTY720-treated (FTY720) mice were prepared and stained with anti-CD3 (blue) and anti-CD11c (green). Bar represents 200 μ m. B: cryosection of spleens stained with anti-CD11c (green), anti-ICAM-1 (red) and anti-MHCII (blue) as indicated. C: FTY720 does not alter the number of DC within the spleen nor the percentage of CD8 α ⁺ DC. Spleens from FTY720-treated and untreated animals were analysed by flow cytometry for the percentage of CD11c⁺ MHC II⁺ DC (left) and the percentage of CD8 α ⁺ cells within the CD11c⁺ MHC II⁺ population has been determined (right; pooled data from three independent experiments). D: Cryosection from spleens of untreated or FTY720-treated mice were stained with anti-MadCAM (red) and anti-CD11c (green). Note the close proximity of marginal sinus lining endothelial cells (MadCAM-1⁺) and CD11c⁺ DC in the case of FTY720 treatment.

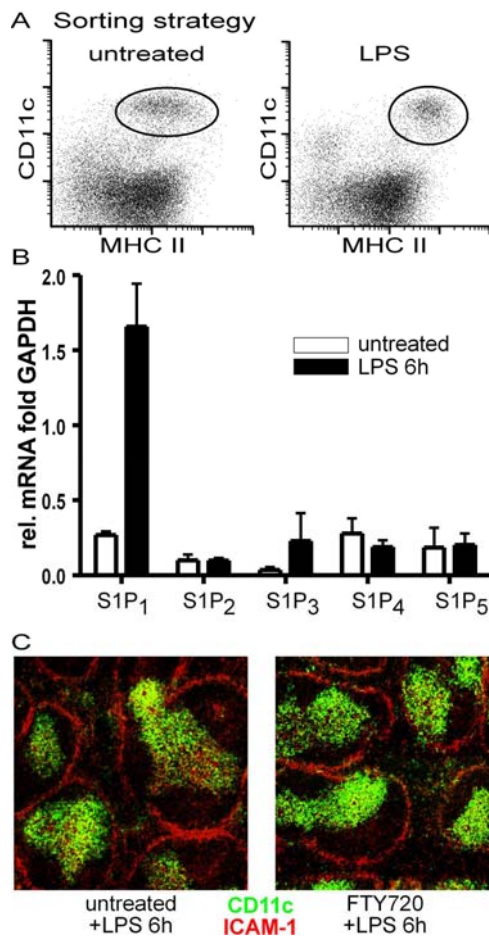


Figure 2. Regulation of S1P receptors on dendritic cells in the spleen under inflammatory conditions and influence of the S1P receptor specific drug FTY720 on maturation induced migration of splenic DC. A: Immature dendritic cells (MHCII⁺CD11c^{high}) and *in vivo* matured DC (MHC I^{high}CD11c^{high}) were sorted from spleen of untreated animals (immature) or animals that had been injected with LPS (mature) 6h before sorting. B: RNA was prepared from sorted cells shown in A and analyzed for the expression of S1P receptor mRNA by qRT-PCR. (mean \pm SD; n= 3 independent experiments). C: Mice were left untreated or treated for 3 days with FTY720 to induce redistribution of DC into the marginal zone. Subsequently, the mice were injected with LPS for 6 h. Cryosections were stained with anti-CD11c (green) and anti-ICAM-1 (red). Note that FTY720 treatment had no effect on the positioning of *in vivo* matured spleen DC.

analyses. However, among all S1P receptors, S1P_{1,4,5} are expressed most prominently whereas S1P₂ and S1P₃ specific signals were rather low yet significant. While splenic DC express more than one S1P receptor and FTY720 is known to inhibit the activity of all S1P receptors except that of S1P₂ (26), we made use of the drug SEW2871, recently shown to interfere exclusively with S1P₁ mediated cellular activities (27). We therefore repeated the experiments described above and analysed the DC localization pattern in spleens of mice treated with SEW2871. The observed effect of SEW2871 on DC localization was identical to that triggered by FTY720 (Fig. 3). Furthermore, FTY720 was not found to interfere with the maturation stage of the DC (based on flow

cytometric analysis of the activation markers CD80, CD86, CD40; data not shown). This indicates that the mis-localization of the DC into the MZ is caused by interrupted S1P₁ signalling and not by epiphenomena like the onset of maturation (or altered integrin expression; see later) possibly prompted by the application of the drug.

Since the vast majority of the spleen resident DC are rather immature, we made use of LPS to induce their maturation. To this end, animals were injected with a low dose of LPS and their spleens were analysed 6 hrs later. As expected, LPS induced migration of the CD11c⁺ DC to the T cell zone of the white pulp in wild type animals indicating DC maturation (15). Concomitantly, CD11c⁺/MHCII^{hi} DC were sorted and subjected to S1P receptor analysis by real time PCR (Fig. 2 A). The LPS matured DC showed a strong up-regulation of S1P₁ as well as of S1P₃ with the S1P₁ signal predominating. In contrast, S1P_{2,4,5} levels remained unchanged (Fig. 2 B). This parallels the results obtained earlier with skin derived DC (23). The LPS stimulation *in vivo* was also performed with mice pre-treated with FTY720. Upon staining splenic sections from treated and untreated animals, it was evident that in both cases the DC had relocated to the T cell zone in an indistinguishable fashion (Fig. 2C). This suggests that LPS driven maturation overrides the FTY720 triggered MZ localization. However, it also overrules the original positioning of the DC in the bridging channels, indicating that S1P signalling has a direct impact on positioning of most of the immature DC but not mature DC. Despite a considerable up-regulation of S1P_{1,3} expression, apparently other guiding mechanisms dominate DC positioning following LPS application.

Upon closer inspection of the DC stained in the splenic sections it was apparent that not all DC redistributed to the MZ following FTY720 or SEW2871 treatment. A smaller proportion of the cells settled in the T cell zone already before FTY720 application and a similarly intense CD11c stain remained detectable there following FTY720 exposure (see Fig. 1A). The splenic DC subpopulation residing in the T cell follicle was

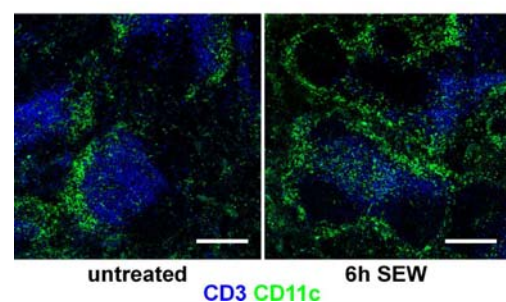


Figure 3. Localization of DC within the bridging channels depends on S1P₁. Mice were left untreated or where gavaged with the S1P₁-specific drug SEW2871 (SEW). After 6h cryosections of spleens were stained with anti-CD11c (green) and anti-CD3 (blue; bars:200 μ m)

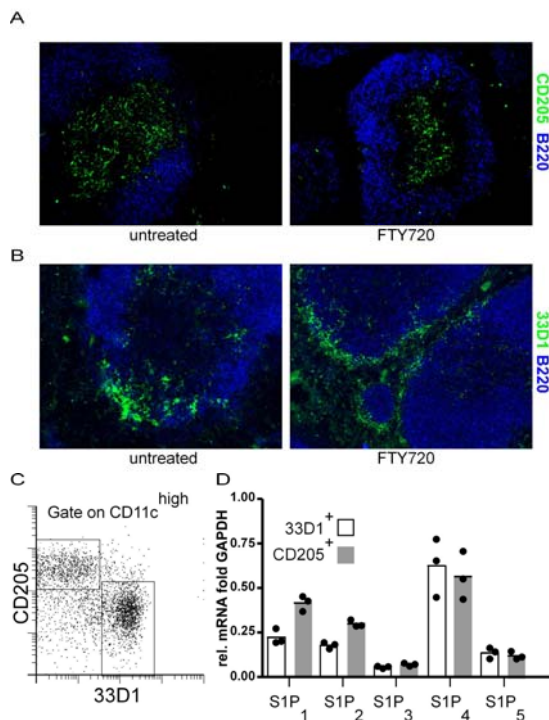


Figure 4. Differential effect of FTY720 on different splenic DC subpopulation and their expression of S1P receptors. A+B: Spleen sections from untreated and FTY720-treated animals were stained with anti-B220 (blue) and antibodies to CD205 (A) or 33D1 (B). Note that FTY720 treatment affects the positioning of 33D1⁺ but not CD205⁺ DC. C: Sorting strategy for 33D1⁺ and CD205⁺ DC from spleen. D: RNA was prepared from sorted cells and mRNA levels of S1P receptors were analysed by real-time PCR. mRNA levels are depicted as fold GAPDH. Each data point represents the value of individual mRNAs of 3 independent experiments.

identified earlier to represent CD8⁺CD205⁺ DC whereas those lodging in/near the bridging channels belong to the CD8⁺CD4⁺33D1⁺ subtype (14). We consequently stained sections of FTY720 treated mice using the two discriminatory markers 33D1 and CD205 (Fig. 4A and B). When compared to untreated spleen, we found that exclusively the 33D1⁺ DC but not the CD205⁺ DC moved into the MZ upon FTY720 influence. The latter remained in the T cell zone even if a subtle T zone-internal movement may have occurred. Thus, inactivation of S1P₁ signalling triggered a DC subtype specific mobilization into the MZ. We were therefore interested in exploring the S1P receptor signature characteristic for the two subtypes under scrutiny. Splenic DC were sorted according to Fig. 4 C and analysed by real time PCR. Interestingly, only receptors S1P₁ and S1P₂ were found to be expressed differentially by the two DC-subtypes whereas S1P_{3,4,5} levels were identical. Since FTY720 treatment remained ineffective regarding a displacement of CD205⁺ DC their even higher S1P₁ level appears irrelevant for their retention in the T cell zone. FTY720 does not inhibit S1P₂ mediated signalling (26). Therefore, it is possible that this particular S1P receptor, whose expression is elevated in these cells compared to 33D1⁺

DC, may contribute to the unaltered positioning of CD205⁺ DC inside the T area. However, as 33D1⁺ DC also express S1P₂, this idea is difficult to reconcile with the observation that 33D1⁺ DC chose the MZ as destination instead of the T cell zone under an otherwise identical FTY720 treatment. Since a long-term treatment with FTY720 ranging over several days did not change the distribution pattern compared to that found after 12 hrs either, it is unlikely that the CD205⁺ DC received insufficiently high amounts of the drug to elicit an effect (data not shown). These observations would suggest that CD205⁺ DC obey another guiding/adhesion-system keeping them in the T cell area and thus rendering them unresponsive to any effects onto their S1P signalling with regard to cellular localization.

The primordial importance of the integrin-system in migration as well as localization of immune cells is well documented. For instance, it has been previously reported that ICAM-1 in combination with VCAM-1 is required for keeping MZ B cells within the MZ, whereas a dependency on either integrin ligand was not found (28). To check for the expression of integrins on DC and integrin ligands on splenic stromal cells, we analysed the respective molecules histologically and by flow cytometry. ICAM-1 is strongly expressed throughout the MZ and the T cell zones of the spleen, whereas MadCAM-1 is present along sinus lining endothelial cells in the marginal sinus (Fig. 5A). Overlapping expression of MadCAM-1 and ICAM-1 can be found in the marginal

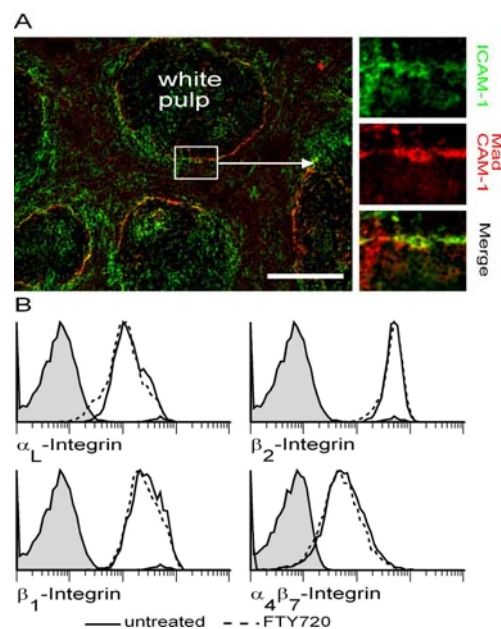


Figure 5. Integrin ligands are expressed in the spleen marginal sinus while the corresponding integrins are expressed on splenic DC. A: Spleen sections were stained with anti-ICAM-1 (green) and anti-MadCAM-1 (red). Inserts show magnification of single integrin ligand expression and merge of ICAM-1 and MadCAM-1 expression. (bar: 200µm); B: Integrin expression on CD11c^{high}MHCII⁺ DC from spleens of untreated and FTY720-treated animals (shown are representative results of at least 2 animals per group analyzed).

sinus (Fig. 5A, inset). DC in the spleen express integrins that mediate adhesion to ICAM-1 (Integrin $\alpha_L\beta_2$) and MadCAM-1 (Integrin $\alpha_4\beta_7$ or $\alpha_4\beta_1$). These integrins are present in high levels on the surface of the DC and their expression remains unaltered under FTY720 treatment (Fig. 5B). To test whether the observed delocalization phenomenon of $33D1^+$ DC depends on distinct integrin ligands, we treated ICAM-1 deficient and MadCAM-1 deficient animals with FTY720. Neither deficiency influenced the redistribution of the $33D1^+$ DC subset in the corresponding mice treated with FTY720 (Fig. 6A,B). However, in mice double deficient for ICAM-1 and MadCAM-1 the DC were no longer equally distributed throughout the MZ even if the FTY720 effect could not be reverted entirely in the double deficient mice. Accumulations of DC in the bridging channels (Fig. 6C, white arrowheads) were still present confirming incomplete mobilization of DC by FTY720 treatment. Taken together, these data point to a role for ICAM-1 and MadCAM-1 driving the DC towards the MZ. Probably because of the known redundancies in the integrin/CAM-adhesion system, we failed to observe complete suppression of the FTY720 effect on DC even in ICAM-1/MadCAM-1 double deficient mice. Other ligands such as VCAM-1 may therefore also play a role in these processes.

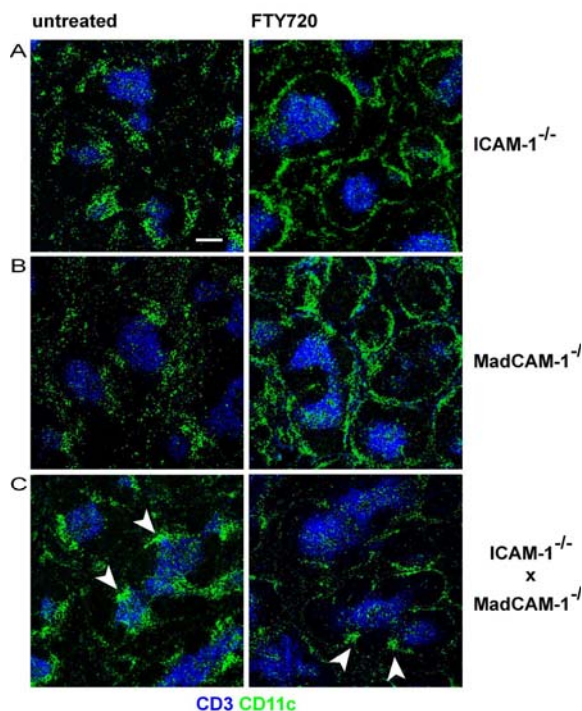


Figure 6. FTY720-induced distribution of DC in the spleen depends on the presence of integrin ligand. Mice deficient for ICAM-1 (A), MadCAM-1 (B), or double deficient for ICAM-1 and MadCAM-1 (C) were left untreated or treated orally with FTY720 for 2-4 days. Spleen sections were stained with anti-CD11c (green) and anti-CD3 (blue). Note that in FTY720-treated mice double-deficient for ICAM-1 and MadCAM-1 the distribution of DC to the marginal zone is strongly reduced with DC still residing in the bridging channels (white arrow heads in C; representative micrographs from 3 (A and B) or at least 9 animals (C) per group).

The outcome of the S1P receptor signalling with respect to cellular localization may be modulated by the chemokine/receptor-system. Indeed, MZ B cells losing their S1P₁-mediated signalling are displaced from the MZ to the B cell zone via CXCR5 activity (22). Accordingly, this redistribution was found to be absent in cells deficient in CXCR5 (not shown) or its ligand (22). CCR7 and its ligands CCL19/CCL21 are part of the most important chemokine receptor/ligand-system for the maintenance of structures in LN and spleen (9). CCL21 is expressed in the T cell zones of the spleen (data not shown) and among the defects observed, CCR7 deficiency or a lack in the ligands (*plt/plt*) causes a less well organized T cell area in the spleen (Fig. 7). However, domains distinguished by accumulations of T cells still exist along with the follicular areas. The distribution pattern of the DC also appears much less structured when compared to wild type spleen. Although many DC locate to the T domains others are found to be scattered throughout the non-follicular areas. To test its effect on DC localization, we treated *CCR7^{-/-}* and *plt/plt* mice with FTY720. The bulk of the $CD11c^+$ DC distributed homogeneously throughout the ICAM-1 expressing MZ surrounding the follicle (Fig.7 and data not shown) whereas a minor fraction remained associated with the T cell domains – a pattern highly reminiscent of that observed in wild type mice upon FTY720 application. Therefore, we conclude that the FTY720-driven MZ allocation of $33D1^+$ DC as well as the retention of $DEC205^+$ DC in the T cell domains is independent of CCR7.

It was hypothesized that CCR7 signals guide DC into the T cell zone following microbial stimulation. Therefore, *CCR7^{-/-}* mice were first treated with FTY720 and subsequently with LPS. Untreated *CCR7^{-/-}* mice that were injected with LPS do not show gross alterations in DC distribution within the spleen (not shown). This observation may be explained by the fact that due to the less organized splenic architecture in CCR7 deficient mice, larger aggregations of DC serving as landmarks are missing. Interestingly, when the mice were treated with FTY720 before LPS injection, nearly all DC were found associated with the T cell domains whereas the MZ was devoid of any CD11c stain (Fig.7). Thus, as in wild type animals, the FTY720 effect is overruled by the LPS induced maturation and migration. More importantly, since already $CD205^+$ DC reside in T domains and also the mature $33D1^+$ DC find their way to the T cell domains in the absence of CCR7, it is assumed that hitherto unresolved chemoattractant mechanisms control the intrasplenic migration and positioning of immature as well as mature DC.

Discussion

The importance of S1P signalling for the migration and positioning of DC has not been studied intensively so far. Previous work suggested an important role for S1P in the mobilization of DC from skin (23) and lung (29) to draining lymph nodes. We detected that the DC

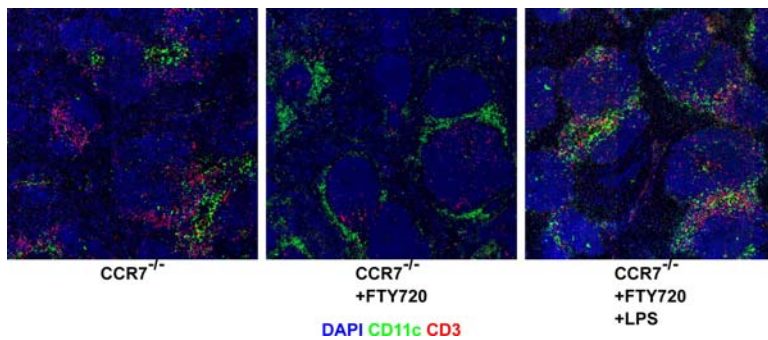


Figure 7. Mobilization of DC into and out of the marginal zone are independent of CCR7. Spleen sections of CCR7-deficient mice were stained with anti-CD3 (red), anti-CD11c (green) and DAPI (blue). Mice were either untreated (A), treated with FTY720 for 3 days (B) or treated for 3 days with FTY720 and subsequently injected with LPS for 6h (C). Representative results from at least four mice per group are shown.

maturation program *in vitro* as well as *in vivo* encompassed up-regulation of S1P₁ and S1P₃ and assumed that the concomitant activation of the small G proteins Rac/Cdc42/Rho provided the stimulated cell with sufficient motility to abandon their sessile stage (23). In the present study we provided evidence that a subpopulation of splenic immature DC, the 33D1⁺ DC, require S1P mediated signalling via S1P₁ in order to maintain their sub-anatomical location in/near the bridging channels. Disruption of S1P₁ signalling due to FTY720 or SEW2871 treatment causes the immature 33D1⁺ DC to leave their position in the bridging channels and to distribute equally into the marginal zone. We are not aware of any other report describing a similar finding for other immature DC populations residing either in the periphery or inside secondary lymphoid tissue. Remarkably, immature CD205⁺ as well as 33D1⁺ DC express a similar pattern of S1P receptors yet only the positioning of the latter DC subtype seems to depend on S1P receptor activity. We hypothesize that the withdrawal of incoming S1P signals predominantly via S1P₁ loosened their anchoring to the adhesive support provided by the bridging channels even though the nature of the adhesive system accomplishing this remains to be determined. The cells start to drift and subsequently halt at cells expressing ICAM-1/MadCAM-1 and additional adhesion receptors thus causing the observed redistribution of 33D1⁺ cells to the MZ. A similar scenario may apply for the CD205⁺ DC. Although they apparently fail to respond to FTY720 triggered S1P receptor inactivation they already reside in an area of detectable expression of ICAM-1 (and probably others). The juxtaposed CAM-ligand expression in the T cell zone may thus provoke the impression of unresponsiveness.

It is considered unlikely that a chemoattractive system guides the 33D1⁺ DC to the MZ. Although it was shown that 33D1⁺ DC express chemokine receptors, these cells failed to migrate *in vitro* to all chemokines tested (30) as well as to S1P (data not shown). This applies also to the CD205⁺ DC and indicates that the immature splenic DC are ignorant to migratory stimuli probably because the apparatus needed for migration is discontinued. This is in line with the concept that immature DC should stay where they are and move on only when antigen uptake and transport are required. But this also raises the

question how these cells arrive at all at their home base in the bridging channels or T cell zones. The turn-over rate of intra-splenic DC is rather high and the existing DC are replaced by new ones (10, 31). Most likely, the DC precursors are recruited from the blood, migrate to the corresponding locations and differentiate into immature DC *on site*, acquiring a non-migratory phenotype. Only upon further differentiation into mature DC do the cells regain migratory potential. As a first step, motility is enhanced by up-regulating S1P₁ and perhaps S1P₃. Complementary to this, the cells gain responsiveness to chemokines or other attractants navigating their active migration. The rather low expression level of S1P receptors observed in immature DC and their subsequent up-regulation in maturing DC as a feature shared by many DC subtypes (at least all studied thus far) would lend further support to this idea.

The pronounced reallocation of the DC involving the MZ is reminiscent of the published effect of FTY720 on MZ B cells. However, whereas DC settle the MZ, MZ B cells leave that zone and migrate into the B cell follicle when animals receive FTY720. The FTY720 effects under discussion demonstrate that S1P is a critical factor in keeping these cells at their original sub-anatomical locations. Indeed, MZ B cells express S1P₁ and S1P₃ apart from marginal amounts of S1P₄ and it was shown that S1P₁ is critically responsible for the retention of MZ B cells in their peri-follicular localization inside the MZ (22). With their rather high levels of S1P₁ and S1P₃, MZ B cells resemble the mature DC that just up-regulated the levels of these receptors. In addition, MZ B cells are able to respond to chemokine signals just as mature DC can. This illustrates that the context of the S1P receptor mediated effects matters: cell type, original location, adhesion receptor repertoire, maturation stage, general responsiveness to chemokines and more. All these factors combine to create an array of different responses and may help to explain why one cell type leaves the MZ whereas the other settles the same zone under otherwise identical external conditions.

Remarkably, MZ B cell migration to S1P *in vitro* is mediated via S1P₃ signalling, whereas their localization *in vivo* depends on S1P₁ activity (22). Similarly, it was

recently reported that migration of mature DC generated *in vitro* also depends on a functional SIP₃ receptor (32) whereas the results presented here provide evidence that the positioning of 33D1⁺ DC in the bridging channels requires SIP₁ activity. Thus, in both cases, cell retention may rely on SIP₁ whereas migration is triggered via SIP₃. Because the physical elements overlap considerably, it is difficult to assess each receptors contributions to either positioning or migration. Positioning is predominantly dependent on adhesive/sessile features whereas migration requires a mix of reiterating steps where adhesive/sessile attributes alternate with motile elements. Since it is known that SIP receptors differentially activate small G proteins responsible in large parts for these activities (33-38), it is conceivable that combined signalling from two or more SIP receptors contributes to migration as well as positioning. Withdrawal of either receptor activity may then cause an imbalance in the activities of Rac/Cdc42/Rho (34, 39). Moreover, the net result "migration" is subject to many contributions since CAMs as well as chemokine receptor signalling is known to influence components required for and contributing to migration (40-47).

It was surprising to observe that the maturation induced migration of intra-splenic DC is accomplished in the absence of CCR7 (Fig.7). This contrasts with the absolute necessity of functional CCR7 for the immigration of maturing DC from the periphery into their draining LN

(8). Currently, the driving force underlying the intra-splenic migration of mature DC into T cell domains in the CCR7-deficient mice is unknown. Although it is widely accepted that CCR7 contributes substantially to this process in the wild type scenario (48), our results suggest that alternative routes exist which can fully compensate the CCR7 deficiency at least in the migratory aspects under discussion. Whether the responsible factors attracting mature DC are produced by T cells, the splenic stroma cells or both remains to be determined. SIP seems not to be involved, since FTY720 treatment could not prevent maturation induced DC redistribution.

Acknowledgements

The authors are indebted to V. Brinkmann for providing FTY720. This work has been funded by a DFG grant (SFB566-A14) to R.F.

Abbreviations

DC, dendritic cell; LPS, lipopolysaccharide; LN, lymph node; SIP, Sphingosine-1-phosphate; MZ, marginal zone; ko, knockout; mAb, monoclonal antibody; wt, wild type, PBS, phosphate buffered saline, CAM: cell adhesion molecule; pLN: peripheral lymph node

References

- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Belz, G. T., W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2002. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol* 80:463-468.
- Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias, and M. van den Broek. 2003. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8⁺ T cell tolerance. *Immunity* 18:713-720.
- Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez, and H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity* 18:605-617.
- Zhang, X., H. Huang, J. Yuan, D. Sun, W. S. Hou, J. Gordon, and J. Xiang. 2005. CD4-8- dendritic cells prime CD4⁺ T regulatory 1 cells to suppress antitumor immunity. *J Immunol* 175:2931-2937.
- Itano, A. A., and M. K. Jenkins. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 4:733-739.
- Vecchi, A., L. Massimiliano, S. Ramponi, W. Luini, S. Bernasconi, R. Bonecchi, P. Allavena, M. Parmentier, A. Mantovani, and S. Sozzani. 1999. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukoc Biol* 66:489-494.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Forster. 2004. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. *Immunity* 21:279-288.
- Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
- Kabashima, K., T. A. Banks, K. M. Ansel, T. T. Lu, C. F. Ware, and J. G. Cyster. 2005. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22:439-450.
- McLellan, A. D., M. Kapp, A. Eggert, C. Linden, U. Bommhardt, E. B. Brocker, U. Kammerer, and E. Kampgen. 2002. Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* 99:2084-2093.
- Wilson, N. S., D. El-Sukkari, G. T. Belz, C. M. Smith, R. J. Steptoe, W. R. Heath, K. Shortman, and J. A. Villadangos. 2003. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 102:2187-2194.
- Belz, G. T., C. M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2004. Cutting edge: conventional CD8 alpha⁺ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 172:1996-2000.
- Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science* 315:107-111.
- Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Schariton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, and A. Sher. 1997. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186:1819-1829.
- Allende, M. L., J. L. Dreier, S. Mandala, and R. L. Proia. 2004. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor,

- SIP1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 279:15396-15401.
17. Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1. *Nature* 427:355-360.
 18. Rosen, H., and E. J. Goetzl. 2005. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5:560-570.
 19. Pabst, O., H. Herbrand, S. Willenzon, T. Worbs, A. Schippers, W. Muller, G. Bernhardt, and R. Forster. 2006. Enhanced FTY720-mediated lymphocyte homing requires G alpha i signaling and depends on beta 2 and beta 7 integrin. *J Immunol* 176:1474-1480.
 20. Brinkmann, V., D. D. Pinschewer, L. Feng, and S. Chen. 2001. FTY720: altered lymphocyte traffic results in allograft protection. *Transplantation* 72:764-769.
 21. Spiegel, S., and S. Milstien. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:397-407.
 22. Cinamon, G., M. Matloubian, M. J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 5:713-720.
 23. Czeloth, N., G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth, and R. Forster. 2005. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol* 175:2960-2967.
 24. Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5:606-616.
 25. Leenen, P. J., K. Radosevic, J. S. Voerman, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann, and W. van Ewijk. 1998. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* 160:2166-2173.
 26. Brinkmann, V., M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C. A. Foster, M. Zollinger, and K. R. Lynch. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277:21453-21457.
 27. Jo, E., M. G. Sanna, P. J. Gonzalez-Cabrera, S. Thangada, G. Tigyi, D. A. Osborne, T. Hla, A. L. Parrill, and H. Rosen. 2005. SIP1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. *Chem Biol* 12:703-715.
 28. Lu, T. T., and J. G. Cyster. 2002. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* 297:409-412.
 29. Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, T. Muller, T. Soullie, M. A. Willart, D. Hijdra, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2006. Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest* 116:2935-2944.
 30. Colvin, B. L., A. E. Morelli, A. J. Logar, A. H. Lau, and A. W. Thomson. 2004. Comparative evaluation of CC chemokine-induced migration of murine CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells and their in vivo trafficking. *J Leukoc Biol* 75:275-285.
 31. Kamath, A. T., S. Henri, F. Battye, D. F. Tough, and K. Shortman. 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100:1734-1741.
 32. Maeda, Y., H. Matsuyuki, K. Shimano, H. Kataoka, K. Sugahara, and K. Chiba. 2007. Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3. *J Immunol* 178:3437-3446.
 33. Ancellin, N., and T. Hla. 1999. Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem* 274:18997-19002.
 - Arikawa, K., N. Takuwa, H. Yamaguchi, N. Sugimoto, J. Kitayama, H. Nagawa, K. Takehara, and Y. Takuwa. 2003. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem* 278:32841-32851.
 35. Graler, M. H., R. Grosse, A. Kusch, E. Kremmer, T. Gudermann, and M. Lipp. 2003. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J Cell Biochem* 89:507-519.
 36. Jaillard, C., S. Harrison, B. Stankoff, M. S. Aigrot, A. R. Calver, G. Duddy, F. S. Walsh, M. N. Pangalos, N. Arimura, K. Kaibuchi, B. Zalc, and C. Lubetzki. 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci* 25:1459-1469.
 37. Kohno, T., H. Matsuyuki, Y. Inagaki, and Y. Igarashi. 2003. Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells. *Genes Cells* 8:685-697.
 38. Kveberg, L., Y. Bryceson, M. Inngjerdigen, B. Rolstad, and A. A. Maghazachi. 2002. Sphingosine 1 phosphate induces the chemotaxis of human natural killer cells. Role for heterotrimeric G proteins and phosphoinositide 3 kinases. *Eur J Immunol* 32:1856-1864.
 39. Okamoto, H., N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu, and Y. Takuwa. 2000. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 20:9247-9261.
 40. Benvenuti, F., S. Hugues, M. Walmsley, S. Ruf, L. Fetler, M. Popoff, V. L. Tybulewicz, and S. Amigorena. 2004. Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* 305:1150-1153.
 41. Kobayashi, M., E. Azuma, M. Ido, M. Hirayama, Q. Jiang, S. Iwamoto, T. Kumamoto, H. Yamamoto, M. Sakurai, and Y. Komada. 2001. A pivotal role of Rho GTPase in the regulation of morphology and function of dendritic cells. *J Immunol* 167:3585-3591.
 42. Ridley, A. J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114:2713-2722.
 43. Srinivasan, S., F. Wang, S. Glavas, A. Ott, F. Hofmann, K. Aktories, D. Kalman, and H. R. Bourne. 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 160:375-385.
 44. Sun, C. X., G. P. Downey, F. Zhu, A. L. Koh, H. Thang, and M. Glogauer. 2004. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood* 104:3758-3765.
 45. Walmsley, M. J., S. K. Ooi, L. F. Reynolds, S. H. Smith, S. Ruf, A. Mathiot, L. Vanes, D. A. Williams, M. P. Cancro, and V. L. Tybulewicz. 2003. Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* 302:459-462.
 46. Wells, C. M., M. Walmsley, S. Ooi, V. Tybulewicz, and A. J. Ridley. 2004. Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci* 117:1259-1268.
 47. West, M. A., A. R. Prescott, E. L. Eskelinen, A. J. Ridley, and C. Watts. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* 10:839-848.
 48. Junt, T., E. Scandella, R. Forster, P. Krebs, S. Krautwald, M. Lipp, H. Hengartner, and B. Ludewig. 2004. Impact of CCR7 on Priming and Distribution of Antiviral Effector and Memory CTL. *J Immunol* 173:6684-6693.

CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions

Lars Ohl,¹ Mariette Mohaupt,² Niklas Czeloth,¹ Gabriele Hintzen,¹ Ziba Kiafard,³ Jörg Zwirner,³ Thomas Blankenstein,² Golo Henning,¹ and Reinhold Förster^{1,*}

¹Institute of Immunology
Hannover Medical School
30625 Hannover
Germany

²Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine
13092 Berlin
Germany

³Department of Immunology
University of Göttingen
37075 Göttingen
Germany

Summary

The CC chemokine receptor CCR7 has been identified as a key regulator of homeostatic B and T cell trafficking to secondary lymphoid organs. Data presented here demonstrate that CCR7 is also an essential mediator for entry of both dermal and epidermal dendritic cells (DC) into the lymphatic vessels within the dermis while this receptor is dispensable for the mobilization of Langerhans cells from the epidermis to the dermis. Moreover, a distinct population of CD11c⁺MHCII^{high} DC showing low expression of the costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86 in wild-type animals was virtually absent in skin-draining lymph nodes of CCR7-deficient mice under steady-state conditions. We provide evidence that these cells represent a semimature population of DC that is capable of initiating T cell proliferation under conditions known to induce tolerance. Thus, our data identify CCR7 as a key regulator that governs trafficking of skin DC under both inflammatory and steady-state conditions.

Introduction

Chemokines are small chemotactic cytokines that regulate the homeostatic migration of leukocytes through lymphoid organs as well as the inflammation-induced recruitment of immune cells to sites of infection and inflammation (Baggiolini, 1998; Cyster, 1999). Data obtained from gene-targeted mice revealed that the complex interactions between DC, T cells, and B cells within specialized compartments of lymphoid tissues are guided by a network of chemokines and chemokine receptors (Cavanagh and Von Andrian, 2002). While naive T and B cells enter lymphoid organs following the interaction of CCR7 with its ligands CCL19 and CCL21, which are expressed at the luminal site of high endothelial venules, antigen-bearing DC migrate from the periphery into lymphoid organs via afferent lymphatics (Forster et al., 1999; Steinman, 1991). Once within the lymphoid organs, DC express CCL19, which is known to attract

naive T cells as well as other DC through the interaction with CCR7 (Luther et al., 2000; Sallusto et al., 1998). In contrast to the widely accepted model for lymphocyte migration, molecular mechanisms regulating DC trafficking are still largely unknown.

Based on the chemokine receptor expression profile of in vitro differentiated DC, as well as on chemokines found to be expressed in the inflamed skin, it has been proposed that the production of chemokines at sites of inflammation recruits bone marrow-derived immature DC to these places (Saeki et al., 1999; Sallusto et al., 1998; Sozzani et al., 1998). According to this hypothesis, transendothelial migration and recruitment of immature DC and monocytes to skin is mediated by the expression of several inflammatory chemokines. These include the CCR4 ligands CCL22 and CCL17 (Campbell et al., 1999; Katou et al., 2001); CCL20, the ligand of CCR6 (Dieu-Nosjean et al., 2000); CCL2, which is a ligand of CCR2 (Barker et al., 1991); as well as the CXCR3 ligands CXCL9, CXCL10, and CXCL11 (Flier et al., 2001). Interestingly, most of the chemokine receptors mentioned were found on immature in vitro differentiated DC, while mature DC have been shown to express primarily the chemokine receptors CCR7 and CXCR4, both known to regulate homeostatic trafficking of lymphocytes (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998). Thus, it has been postulated that a switch in chemokine receptor expression enables activated DC to leave the site of inflammation and to migrate to the T cell zones of the draining LN via afferent lymphatics. Indeed, we have demonstrated earlier that CCR7 deficiency, in addition to defective T and B cell homing, causes severely impaired migration of activated Langerhans cells (LC) into draining LN (Forster et al., 1999). Since impaired migration of LC has also been observed in antigenically challenged *plt/plt* mice, which lack expression of the CCR7 ligands CCL19 and CCL21-Ser (Gunn et al., 1999), we were interested in further clarifying the role of this chemokine receptor in DC migration.

We now provide strong evidence that, while CCR7 seems to be dispensable for the initial mobilization of LC within the epidermis, it is indispensable for DC migration into afferent dermal lymphatics. Moreover, the absence of the semimature DC population (CD11c⁺MHCII^{high}, CD40^{int}, CD80^{low}, CD86^{low}) in LN of unchallenged CCR7-deficient mice demonstrates that CCR7 is essentially required for the steady-state migration of skin-derived DC in the absence of inflammatory signals. We show that these cells induce antigen-specific T cell activation under conditions known to induce tolerance. Since adoptive transfers demonstrate that this function is severely impaired in CCR7-deficient animals, our data point to a role of CCR7 in the maintenance of peripheral tolerance.

Results

CCR7 Is Required for the Entry of DC into Dermal Lymphatics

In an earlier study, we reported that CCR7-deficient mice show a severe decrease in the accumulation of cutane-

*Correspondence: foerster.reinhold@mh-hannover.de

ous DC in skin-draining LN following skin painting with FITC (Forster et al., 1999). However, it remained unclear at which step CCR7 deficiency interferes with DC migration from the skin to the draining LN. Therefore, we studied the migration process of these cells in greater detail. Using a mAb specific for Langerin, there was no obvious difference regarding shape and distribution of Langerhans cells (LC) within freshly isolated epidermis between wild-type and CCR7-deficient mice (Figures 1A and 1B). In order to test the mobilization capacity of peripheral DC in vitro, skin explants were floated on culture medium. After 24 hr, the epidermis was separated from the dermis and analyzed by immunohistology. Within this period of time, LC changed their morphologic appearance and decreased in numbers in both wild-type and CCR7-deficient skin (Figures 1C and 1D). At the same time, DC in the dermis of wild-type mice gave rise to formations known as “dermal cords” (Figure 1E) representing the accumulation of MHCII⁺ DC including Langerin-positive cells along dermal lymphatics after the in vitro culture of skin explants (Larsen et al., 1990; Weinlich et al., 1998). Interestingly, formations resembling dermal cords were never observed in the dermis of CCR7-deficient mice, although MHCII⁺ DC and Langerin⁺ cells were present (Figure 1F). In contrast, analysis of the culture medium collected 24 and 48 hr after the onset of skin explant culture revealed a 3- to 4-fold increase in the number of MHCII⁺CD86⁺ cells emigrated into the culture medium of skin explants isolated from CCR7-deficient mice when compared to wild-type mice (Figure 1G). These data demonstrate that CCR7 is essentially involved in the migration of DC towards or into lymphatics within the dermis, an observation that is in agreement with the expression of the CCR7-ligand CCL21 in lymphatic endothelium (Saeki et al., 1999).

In Vivo Activation of Langerhans Cells

Analyzing the number and distribution of resident epidermal DC in untreated wild-type and CCR7^{-/-} mice using anti-langerin mAb staining on epidermal sheets isolated from the ear, we could not observe any significant difference with regard to distribution or density of MHC class II⁺ cells between wild-type and CCR7 mutants. Wild-type epidermis harbored 454 ± 35 MHC class II⁺ cells/mm² while that of CCR7-deficient animals contained 447 ± 33 /mm² (mean \pm SD, $p < 0.01$, Figure 1H, open columns). To further investigate the emigration of LC from the epidermis, we applied an in vivo migration model. LC migration was induced by sensitizing the ear skin with FITC, and 18 hr later the frequency of Langerin⁺ cells in the epidermis was analyzed. As shown in Figure 1H, LC were mobilized from the epidermis of wild-type and CCR7-deficient mice to the same extent. These data, together with the unimpaired in vitro emigration of CCR7-deficient LC from the epidermis (see Figures 1D and 1G), demonstrate that CCR7 is not required for the initial step of LC mobilization, i.e., the migration from the epidermis toward the dermis. Instead, our observations point to a decisive role for CCR7 in the entry of activated LC into draining lymphatics once these cells reach the dermis.

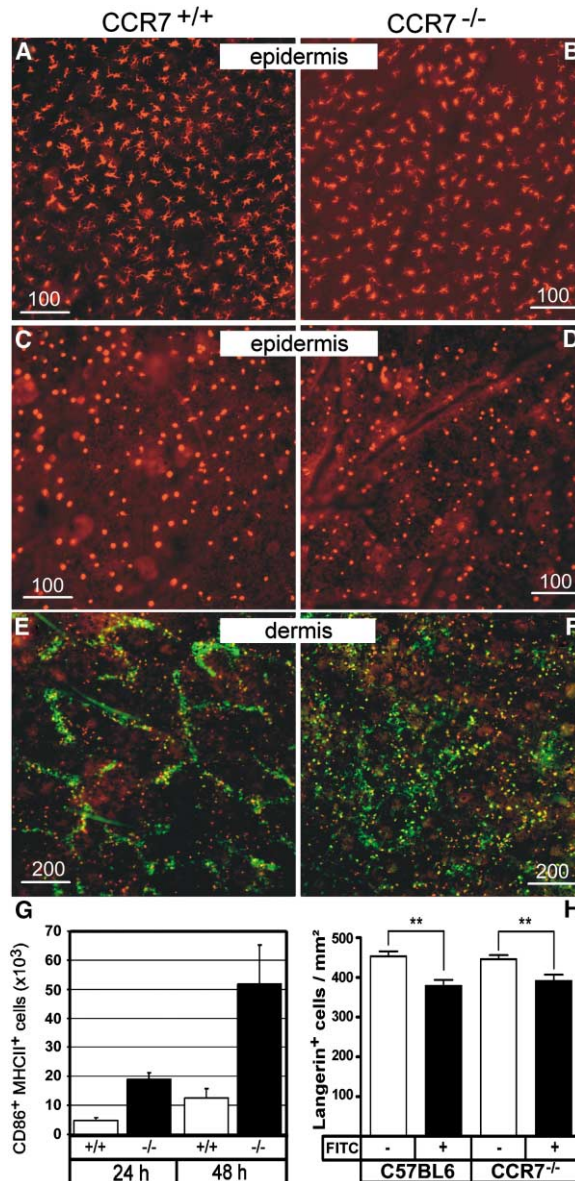


Figure 1. Effects of CCR7 Deficiency on Distribution and Mobilization of Langerhans Cells and Skin Dendritic Cells
(A–F) To analyze LC distribution in the untreated skin, epidermal sheets were prepared from the ear of wild-type (A) or CCR7^{-/-} (B) mice and stained with rat anti-Langerin mAb (clone 929F3) and mouse anti-rat-Cy3. In the explant model, skin flaps were isolated from wild-type (C and E) and CCR7^{-/-} (D and F) ear and floated on tissue culture medium for 48 hr before epidermis (C and D) was separated from dermis (E and F) followed by staining with a rat anti-Langerin (C–F) or FITC-conjugated anti-MHCII mAb (E and F). (G) The number of CD86⁺MHCII⁺ cells emigrated into the tissue culture medium 24 hr and 48 hr after the onset of culture. (H) Ears of C57BL6 and CCR7^{-/-} mice were treated with 0.1% FITC in acetone/dibutylphthalat or carrier alone. Mice were sacrificed 18 hr later and epidermal sheets were stained with rat anti-Langerin mAb (clone 929F3) and mouse anti-rat-Cy3, and the number of Langerin-positive cells was determined by epi-fluorescent microscopy. Data are derived from three images per epidermal sheet (10 \times original magnification, 0.8 mm²/image) of at least six ears of each genotype and treatment (** $p < 0.01$, unpaired t test).

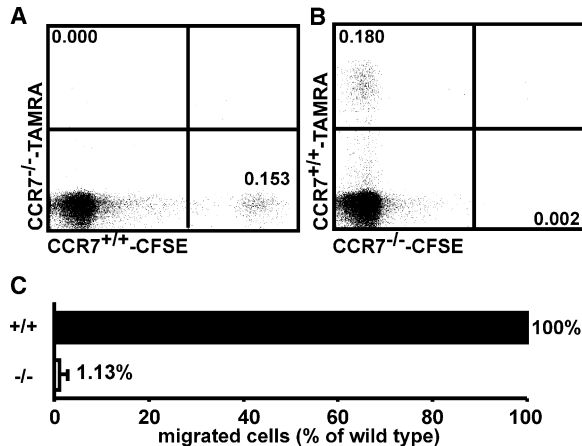


Figure 2. CCR7-Deficient DC Fail to Migrate to Skin-Draining Lymph Nodes

(A) In vitro differentiated, bone marrow-derived DC from wild-type and CCR7-deficient mice were labeled with CFSE and TAMRA, respectively, mixed at equal numbers, and injected i.c. into the right foot pad. After 36 hr, the popliteal LN was removed and analyzed for the presence of immigrated DC.

(B) Same as (A) with the exception that wild-type DC were labeled with TAMRA and CCR7-deficient DC with CFSE and cells were injected into the left food pad of the same mice used in (A).

(C) Mean \pm SEM of the data derived from 8 popliteal LN of the experiments shown in (A) and (B).

In Vitro Differentiated CCR7-Deficient DC Fail to Migrate into the Draining LN

To further substantiate the hypothesis that CCR7 is required for the entry of DC into lymphatics, we used bone marrow-derived in vitro differentiated DC. TNF α /PGE $_2$ -matured DC from wild-type and CCR7-deficient mice were labeled with the fluorescent dyes CFSE (green) and TAMRA (red), respectively, mixed at equal numbers and injected i.c. into the right footpad of wild-type mice. In order to rule out that the dye-labeling procedure adversely influences the migration of the DC, TAMRA-labeled wild-type and CFSE-labeled CCR7 $^{-/-}$ DC were injected into the left footpad of the same animals. As demonstrated in Figures 2A and 2B, only DC derived from wild-type mice could be identified in significant numbers in the popliteal LN 36 hr after transfer, while the CCR7-deficient DC failed to immigrate into the LN (Figure 2C). These data are consistent with previous findings (Martin-Fontecha et al., 2003) and further support the hypothesis that CCR7 is essentially required for DC to migrate from the skin toward the LN via the CCL21 expressing lymphatics.

Lack of CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$ Cells under Steady-State Conditions in Skin-Draining LN of CCR7-Deficient Mice

Since several distinct DC populations have been identified in lymphoid organs in the mouse, presumably serving different biological functions (Shortman and Liu, 2002), we further analyzed the subpopulations of DC present in peripheral LN. While the total number of CD11c $^+$ DC was reduced to 60% in CCR7-deficient mice

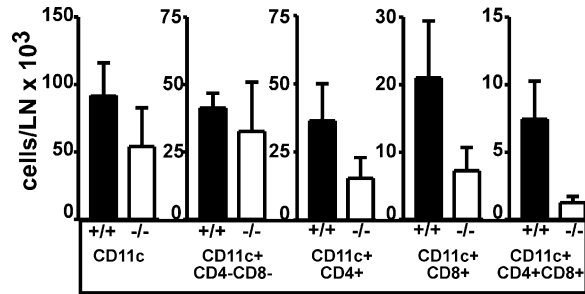


Figure 3. Reduced Numbers of Distinct DC Subsets in CCR7-Deficient Mice

The total number of different DC subtypes from wild-type (filled columns) and CCR7-deficient (open columns) mice was determined per LN by flow cytometry using the markers as indicated (pools of 10 skin-draining LN per animal; data from three C57BL6 and three CCR7-deficient C57BL6 mice).

(Figure 3), there was no significant difference in numbers regarding CD4 $^-$ CD8 $^-$ DC. In contrast, CD4 $^+$ DC and CD8 $^+$ DC were reduced to 42% and 34%, respectively. Of interest, DC expressing both CD4 as well as CD8 were particularly scarce in the LN of CCR7 $^{-/-}$ mice (only 17% of the cell count of wild-type mice; Figure 3). These data indicate that CCR7 deficiency causes an imbalance among defined subpopulations of DC present in peripheral LN in the steady state. Further analysis revealed a population of CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$ DC present in all skin-draining but not organ-draining LN of wild-type mice that was almost completely absent in skin-draining LN of CCR7 mutants (Figures 4A–4C). Since we noticed impaired migration of skin DC after skin sensitization in CCR7-deficient mice (data not shown and Forster et al., 1999), and based on the observation that 24 hr after FITC-skin sensitization all FITC $^+$ cells in the draining LN of wild-type mice display this particular CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$ phenotype (data not shown), we further characterized this cell population. In wild-type animals within the population of CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$, a subpopulation exclusively expressed CD207/Langerin, a marker thought to be specific for LC (Figure 4D). These data indicate that these skin-derived LC show a CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$ phenotype once they reached the draining LN. Neither the very few remaining cells in the gate containing CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$ cells nor CD11c $^+$ cells with lower expression levels of MHCII in the skin-draining LN of CCR7 $^{-/-}$ mice expressed CD207 (Figure 4E), indicating that CCR7 is indispensable for the steady-state migration of LC to lymphoid organs.

In order to further substantiate the hypothesis that CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$ cells represent DCs that migrate to LN under steady-state conditions, Balb/c mice that were born and maintained in a germ-free environment were analyzed. In skin-draining LN of these animals, CD11c $^+$ MHCII $^{\text{high}}$ cells were identified in numbers comparable to those obtained from SPF animals (data not shown). It has recently been suggested that epidermal DCs are CD40 $^{\text{high}}$ CD11c $^{\text{high}}$ while dermal DCs are CD40 $^{\text{high}}$ CD11c $^{\text{inter}}$ in LN (Ruedl et al., 2000). Expression of these markers was assessed on DCs isolated from wild-type and CCR7-deficient LN. We observed that CD40 $^{\text{high}}$ CD11c $^{\text{high}}$ LC are virtually absent in CCR7-deficient mice (popula-

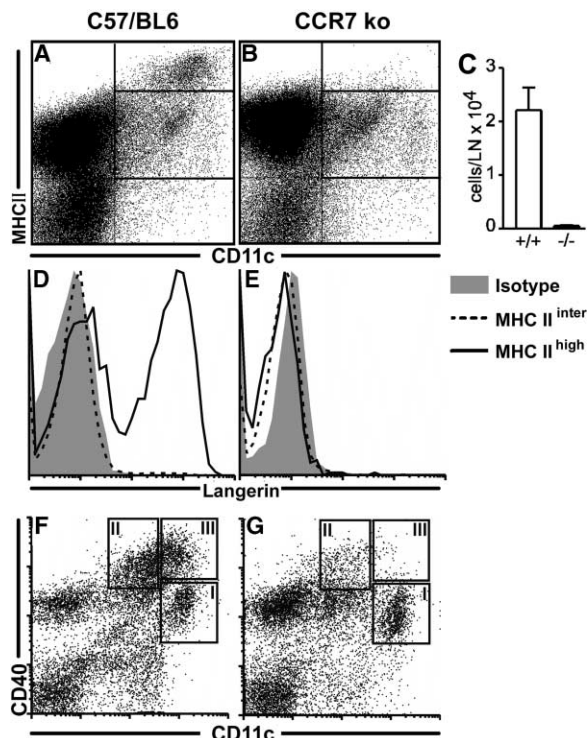


Figure 4. Lack of Skin-Derived DC and Langerhans Cells in Skin-Draining LN of CCR7-Deficient Mice

(A and B) LN cells derived from 10 skin-draining LN (inguinal, axillary, brachial, popliteal, and facial) of C57BL/6 (A) and CCR7-deficient C57BL/6 (B) mice were pooled and analyzed for the expression of CD11c and MHCII.

(C) Number of cells falling within the upper right gate shown in (A) and (B) (data derived from three wild-type and three mutant mice of one experiment; similar data were derived from at least six additional mice of each genotype).

(D) Langerin⁺ cells were found only in the CD11c⁺ MHCII^{high} DC population (solid line, upper right gate shown in [A] and [B]) present in wild-type mice, whereas MHCII^{inter} DC (dotted line, middle right gate shown in [A] and [B]) do not express Langerin.

(E) In CCR7-deficient mice, neither the residual MHCII^{high} nor the MHCII^{inter} DC population contained any Langerin⁺ cells.

(F and G) Skin-draining lymph nodes of CCR7-deficient mice lack CD40^{high} DC populations containing skin-derived DC. Cells from skin-draining LN of four wild-type mice (F) and four CCR7^{-/-} mice were enriched for DC by density gradient centrifugation. DC were stained with anti-CD11c and anti-CD40.

tion III in Figures 4F and 4G). CD40^{high}CD11c^{inter} cells, which contain dermal DC, are also strongly reduced in CCR7^{-/-} mice (population II in Figures 4F and 4G). A third DC population characterized as CD40^{inter}CD11c^{high} (population I in Figures 4F and 4G), which has not been associated with skin DC (Ruedl et al., 2000), is present in CCR7-deficient mice. These data add further evidence to our hypothesis that CCR7 controls the migration of both epidermal and dermal DCs under steady-state conditions.

Expression of CCR7 on Lymph Node and Epidermal DC

Since CCR7-deficient mice missed several DC populations in peripheral LN, it was of interest whether CCR7

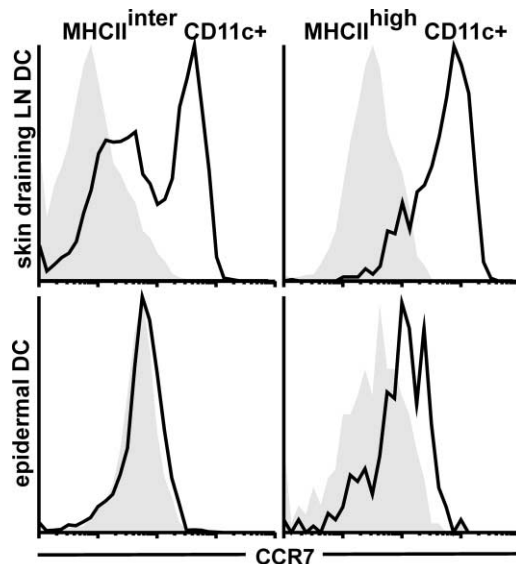


Figure 5. Expression of CCR7 on LN Dendritic Cells and Freshly Isolated Epidermal Dendritic Cells

Lymph node cells (upper panel) or cells isolated from ear epidermis (lower panel) of C57BL/6 mice were stained with anti-MHCII, anti-CD11c, and rat anti-mCCR7 (solid line) or isotype control (shaded area) and mouse anti-rat-Cy5. Expression of CCR7 on CD11c⁺ cells expressing intermediate levels of MHCII (left column) and high levels of MHCII (right column) is shown.

is differently expressed on DC. Applying a recently generated anti-CCR7 mAb, the CD11c⁺MHCII^{high} population, which is missing in CCR7-deficient mice, was found to uniformly express CCR7, while this chemokine receptor was only expressed on a subpopulation of CD11c⁺MHCII^{inter} DC (Figure 5, upper panel). The expression of CCR7 on LC residing in the epidermis was then investigated. Analyzing freshly isolated epidermal LC, it was possible to separate these cells based on the amount of surface MHCII molecules into two groups: MHCII^{inter} and MHCII^{high} (data not shown). However, no CCR7 expression was found on MHCII^{inter} LC, while CCR7 expression was evident on MHCII^{high} LC to some degree (Figure 5, lower panel). These data indicate that some DC in the skin start to spontaneously upregulate CCR7, thereby allowing steady-state trafficking to the draining LN.

CD11c⁺MHCII^{high} Cells Are Semimature DC at Steady State

It has been reported that skin DC migrating under noninflammatory conditions into the draining LN display a semimature phenotype, since they express high levels of MHCII molecules typical for matured DC, but lack high expression levels of costimulatory molecules such as CD80 and CD86 (Lutz and Schuler, 2002; Stoitzner et al., 2003). Therefore, we further characterized CD11c⁺MHCII^{high} cells from skin-draining LN for the expression of costimulatory molecules with and without prior FITC skin painting. The epicutaneous application of FITC induced a strong mobilization of CD11c⁺MHCII^{high} cells, increasing the proportion of this particular cell population within all LN cells from 3.4% to 8.6% (mean of 6

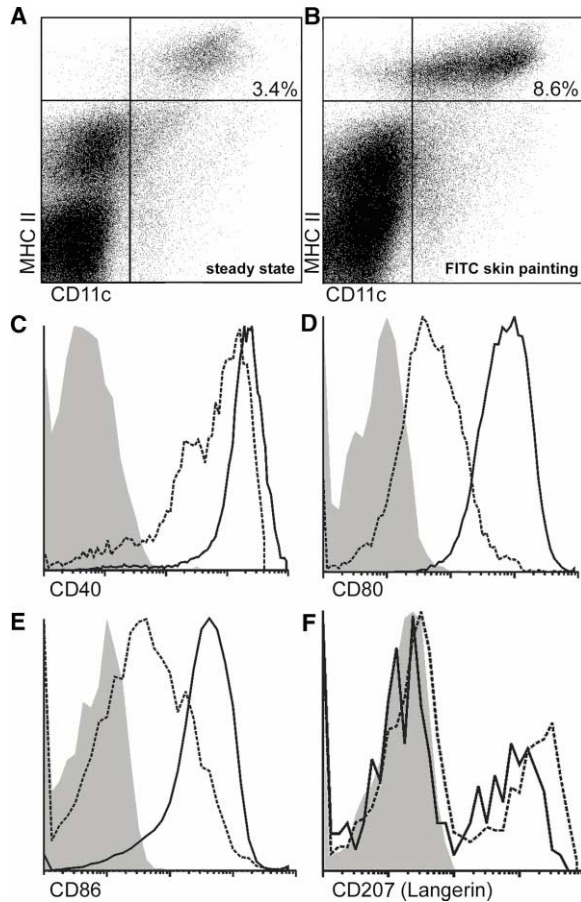


Figure 6. Steady-State CD11c⁺MHCII^{high} DC in Wild-Type Mice Display a “Semimature” Phenotype

Cells from skin-draining LN of naive wild-type mice (A) or of mice 24 hr after FITC skin painting (B) were analyzed for expression of MHCII and CD11c. The numbers shown represent the percentage of cells within the CD11c⁺MHCII^{high} population derived from six draining LN each. (B) The CD11c⁺MHCII^{high} subpopulation was further analyzed for expression of costimulatory molecules CD40 (C), CD80 (D), and CD86 (E) as well as for Langerin (F). Shaded area, isotype control; dotted line, gate on CD11c⁺MHCII^{high} cells of untreated mice; solid line, gate on CD11c⁺MHCII^{high} FITC⁺ cells 18 hr after FITC skin painting.

LN, Figures 6A and 6B). After sensitization with FITC, a moderate increase in CD40 expression accompanied by a profound upregulation of CD80 and CD86 was observed in the FITC⁺ CD11c⁺MHCII^{high} cell population, when compared with the cells in LN of untreated mice (Figures 6C–6E). The percentage of CD207⁺ DC within the CD11c⁺MHCII^{high} population was not increased by FITC painting, suggesting that, in addition to LC, other skin-derived DC essentially contribute to the population of FITC-positive DC isolated from draining LN (Figure 6F). The phenotype of the CD11c⁺MHCII^{high} cells—low levels of costimulatory molecules that are upregulated following activation—indicate that these cells are possibly semimature, steady-state migratory DC. Since the migration of these cells is strongly impaired in CCR7-deficient mice, our data point to a pivotal role for CCR7 in the migration of skin DC to the skin-draining LN under inflammatory as well as under steady-state conditions.

Impaired Proliferative Response of Antigen-Specific T Cells after Dermal Antigen Application in CCR7^{-/-} Mice

To further clarify whether the impaired migration of activated skin DC observed in the FITC painting model has implications for the subsequent stimulation of adoptively transferred antigen-specific T cells, the OT-II adoptive transfer system was applied to C57BL/6 and CCR7^{-/-} C57BL/6 mice. OT-II T cells express an ovalbumin-specific MHCII-restricted T cell receptor and can be used as a model for antigen-specific T cell responses. Intracutaneous/subcutaneous (i.c./s.c.) application of various amounts of antigen (0.1 μg to 10 μg) together with CpG-DNA as an adjuvant induced a strong and dose-dependent induction of antigen-specific T cell proliferation in wild-type mice (Figure 7A, upper panel). This proliferative response was markedly reduced when OT-II cells (CCR7-positive) were transferred to CCR7-deficient mice. Under these experimental conditions—CCR7 deficiency affects DC but not T cell migration—a moderate proliferative response was identified at the highest amount of antigen applied (10 μg), while proliferation was barely detectable at lower doses (Figure 7A, lower panel).

We next tested the potential of i.c./s.c. applied LPS-free antigen to promote antigen-specific proliferation of T cells in the draining LN in the absence of adjuvant and danger signals. In accordance with previous results, proliferation of adoptively transferred MHCII-restricted OT-II cells was strongly induced in the draining LN of wild-type mice after i.c./s.c. application of small amounts of soluble antigen (Figure 7C), while no proliferating antigen-specific T cells were identified after PBS injection to the contralateral side (Figure 7D). As described above for inflammatory conditions, a dose-dependent proliferation of OT-II cells was observed only if cells were transferred into wild-type animals (Figure 7C, upper panel) but not after transfer into CCR7-deficient recipients (Figure 7C, lower panel). In the latter case, no proliferation was observed at 0.1 μg and 1 μg OVA while a very weak response was found at 10 μg OVA.

Conjugation of antigen to the anti-CD205 mAb NLDC145 has been shown to allow efficient presentation of the conjugated antigen in MHCII molecules and also permits effective crosspresentation in MHCI molecules (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001). Application of this antigen:mAb conjugate allows antigen targeting to DC without maturation, thus resembling DC migration and antigen presentation in the steady state. Again, following the application of OVA coupled to anti-CD205, no substantial proliferation of OT-II cells occurred in the draining LN of CCR7-deficient mice. Draining LN contained only approximately 4 times the number of proliferating T cells compared to those observed in the nondraining LN, while this number was increased 165-fold when comparing draining and nondraining LN in wild-type animals (Figure 7E, data not shown). In order to rule out that priming did occur in CCR7-deficient mice but was not sufficient to induce proliferation, the expression of the early activation marker CD69 was analyzed 36 hr after immunization with 1 μg OVA without adjuvant. As shown in Figure 7F, a profound upregulation of CD69 on OT-II cells was observed upon adoptive transfer into wild-type recipients but not when trans-

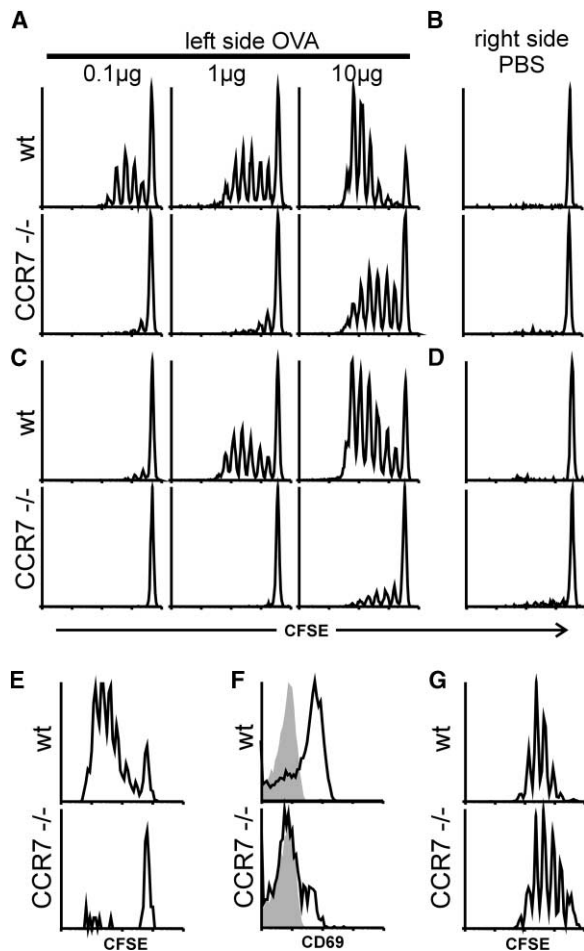


Figure 7. CCR7-Deficient Mice Show Impaired T Cell Response in a Model of T Cell Triggering by s.c. Applied Antigen under Inflammatory and Steady-State Conditions

(A–D) 24 hr after adoptive transfer of CFSE-labeled OT-II cells into C57BL/6 and CCR7^{-/-} mice, OVA (0.1–10 μg as indicated) was injected s.c. into recipient's left ear (A and C) while PBS was injected into the same recipient's right ear (B and D) together with 10 μg CpG1668 (A and B) or without adjuvant (C and D). Proliferation of the OT-II cells in the draining LN was analyzed 72 hr after antigen application. Data shown for each experimental setup are representative for at least six LN. For PBS injection, data are shown for right facial LN of mice that received 10 μg OVA into their left ear.

(E) Instead of soluble OVA, ovalbumin chemically coupled to NLDC145 mAb (1 μg) was used for s.c. application in the same adoptive transfer model.

(F) OT-II cells, adoptively transferred to C57BL/6 wild-type mice, strongly upregulate the activation marker CD69 36 hr after s.c. application of 1 μg LPS-free OVA, while OT-II cells transferred to CCR7-deficient mice show weak upregulation on few TCR transgenic cells; shaded area, isotype control.

(G) Intravenous application of 1 mg OVA induces comparable proliferation of adoptively transferred OT-II cells in peripheral LN of wild-type and CCR7-deficient mice.

ferred to CCR7-deficient mice. These data suggest that transport of antigen to the draining lymph node is impaired due to lack of CCR7 on APC, thereby hampering T cell activation. However, if lack of antigen bearing APC is a limiting event in the LN of CCR7-deficient mice, systemic application of antigen should overcome this restriction. To test this idea, 1 mg OVA was injected

intravenously into wild-type and CCR7-deficient mice. A comparable proliferative response of the OT-II cells was observed irrespective of transfer to wild-type or CCR7-deficient recipients (Figure 7G).

Discussion

Several lines of evidence suggest that DC reprogram their chemokine receptor expression profile during defined maturation stages. One of the two chemokine receptors expressed on mature but not on immature bone marrow-derived DC is CCR7 (Sallusto et al., 1998; Yanagihara et al., 1998), a receptor also known to regulate entry of lymphocytes into LN (Forster et al., 1999) and the antigen-induced migration of B cells from the B cell follicle to the outer T cell area during the initiation of a B cell immune response (Reif et al., 2002). In addition, it has been shown previously that the migration of skin DC toward the draining LN is impaired in CCR7-deficient mice under inflammatory conditions (Forster et al., 1999).

Within the heterogeneous group of DC, LC represent the population of skin-resident DC that have been most intensely studied with regard to their migratory properties. LC reside within basal and suprabasal laminae of the epidermis and are equipped with the machinery to capture and process potentially harmful pathogens at the time that they invade the body, thereby rapidly initiating an immune response (Schuler and Steinman, 1985; Stingl et al., 1980). It has been known for a long time that skin DC, including LC, are mobilized to migrate to the draining LN once they have been activated, but recent work demonstrated that these cells are also found in the draining LN in the absence of an inflammatory event, suggesting a continuous turnover of DC, a process described as steady-state migration (Hemmi et al., 2001; Merad et al., 2002; Yoshino et al., 2003).

Data presented here strongly suggest that CCR7 is involved in both activation-induced as well as steady-state turnover of skin DC. FITC-bearing CD11c⁺MHCII^{high} cells are absent in the draining LN after skin sensitization of CCR7-deficient mice (inflammatory condition). More importantly, CD11c⁺MHCII^{high} cells are also missing in the skin-draining LN under steady-state conditions. This phenotype is corroborated by the observation that a considerable proportion of CD11c⁺MHCII^{high} cells express CCR7 at a moderate level already in the epidermis, indicating their imminent emigration. In skin-draining LN of wild-type mice, either after skin sensitization or in the steady state, a subpopulation of these CD11c⁺MHCII^{high} cells expresses the Langerhans cell marker Langerin, CD207 (see Figure 4), suggesting that CCR7 is involved in recruiting LC as well as other skin-derived DC into skin-draining LN under inflammatory and steady-state conditions.

Although less pronounced than observed in CCR7^{-/-} mice, impaired mobilization of activated skin DC has also been reported in a naturally occurring mutant, the paucity of lymph node T cells (*plt/plt*) mouse (Gunn et al., 1999). This strain carries a deletion leading to loss of CCL19 expression as well as expression of one of the two CCL21 genes. The CCL21 gene missing in *plt/plt* mice codes for a CCL21-ser gene product that differs

in a single position from a second, CCL21-leu gene that is still present in *plt/plt* mice. While the CCL21-ser gene is specifically expressed in lymphoid organs, CCL21-leu is in particular found in nonlymphoid organs including lymphatic vessels of the skin (Luther et al., 2000; Nakano and Gunn, 2001; Vassileva et al., 1999). This residual expression of CCL21-leu in *plt/plt* mice might explain why activated skin DC are still able to form "dermal cords" in a skin explant model and to migrate to draining LN in *plt/plt* mice (Gunn et al., 1999) but not in CCR7^{-/-} mice. Residual expression of CCL21 in *plt/plt* mice might also be responsible for unaffected steady-state migration that has been recently reported in these mice (Yoshino et al., 2003).

There is now accumulating evidence for a considerable proportion of DC of LN and spleen constitutively presenting self-antigens in the steady state, a mechanism believed to induce tolerance (Hugues et al., 2002; Wilson et al., 2003). Application of endotoxin-free antigens without adjuvant, or antigens specifically coupled to an anti-CD205 mAb, mimics confrontation of an organism with a harmless or self-antigen, and recent studies demonstrated that DCs presenting antigen under such conditions, i.e., DCs under steady state, will not induce an inflammatory immune response. Although they are able to vigorously stimulate T cell proliferation, these proliferated T cells are unresponsive to further stimulation and are eliminated a few days later, most likely due to lack of costimulatory signals (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001). The characteristics of these tolerance-inducing cells, which have also been called "semimature DC," have been reviewed recently (Lutz and Schuler, 2002). Stoizner et al. (2003) characterized steady-state migration of LC. Using a mAb specific for Langerin, they demonstrate that in steady state, LC present in skin-draining LN express low levels of maturation markers such as 2A1, CD86, and CD40 and high levels of MHCII as well as CD11c. These observations are in accordance with the data presented here. Langerin⁺ cells are identified as part of the CD11c⁺MHCII^{high} population, which is entirely missing in CCR7-deficient mice under steady-state conditions. Peripheral LN of germ-free mice invariably possess this DC population, excluding the possibility that our observation of a continuously mobilized DC population was caused by ongoing but clinically not apparent infectious processes in the skin.

Our data derived from skin explant cultures confirm the hypothesis that CCR7 is selectively required to allow skin DC with a mature or semimature phenotype to enter skin lymphatics. In vitro cultures of skin explants induce the accumulation of DC along dermal lymphatics in wild-type mice, the so called "dermal cords," an artificial structure occurring in experimental situations when the flow of lymph fluid is abrogated (Larsen et al., 1990). The formation of dermal cords is also observed in explant culture of skin derived from *plt/plt* mice, which express CCL21-Leu in dermal lymphatics (Gunn et al., 1999). In contrast, cultured skin derived from CCR7-deficient mice is completely devoid of these structures, pointing to a critical role of CCR7 in the migration of skin DC toward and into dermal lymphatics. The decisive and selective role for CCR7 in guiding cutaneous DC into skin lymphatics was corroborated by in vivo mobilization experiments, indicating that CCR7 is not required for

the initial mobilization of LC within the epidermis, since no differences regarding the emigration of LC from the epidermis were observed between wild-type and CCR7-deficient mice following activation with FITC (Figure 1H).

The impaired migration of cutaneous DC observed in CCR7-deficient mice is reflected by the reduced capacity of CCR7-deficient mice to induce antigen-specific T cell proliferation after s.c. or i.d. application of antigen. Small amounts of antigen without additional adjuvant, reflecting tolerance-inducing conditions, failed to induce proliferation of antigen-specific lymphocytes in the draining LN of CCR7-deficient hosts. However, this small dose of antigen is capable of inducing a vigorous proliferation of the adoptively transferred OT-II T cells in wild-type hosts (Figure 7). The correlation of impaired DC migration and lack of antigen-specific proliferation in CCR7-deficient mice suggests that efficient T cell stimulation after low-dose antigen application can only be triggered by specialized antigen-presenting cells, most likely by CD11c⁺MHCII^{high} DC entering the draining LN. In contrast, a higher dose of antigen together with adjuvant was sufficient to induce a weak proliferation of antigen-specific T cells in CCR7-deficient hosts. Passive transport of soluble antigen with the lymph fluid or by cells other than the described CD11c⁺MHCII^{high} cells might contribute to presentation to and stimulation of T cells in the LN, although at lower efficiency. The idea that impaired migration of DC from the skin to the draining LN represents the limiting factor for the delivery of antigen to the LN of CCR7-deficient mice is supported by our finding that intravenous application of antigen induced a profound proliferative response of OT-II cells in both wild-type and CCR7-deficient animals. Nevertheless, since LN are morphologically altered in CCR7-deficient mice, we cannot entirely exclude the possibility that disturbed LN architecture might partially contribute to the reduced proliferative response of adoptively transferred T cells following antigen application.

The present study also reveals that in addition to recently immigrated skin DC, other subsets of DC are also diminished in LN of CCR7 mutants. The function and kinetics of the different DC subpopulations identified in lymphoid organs of man and mouse are currently under intense investigation. In mouse LN and spleen, various DC subsets expressing different surface markers were recently identified (reviewed in Shortman and Liu, 2002). One of these subsets, classified by its expression of CD8 (formerly designated as the lymphoid DC subset), is in particular missing in CCR7-deficient mice. Since it has been suggested that CD8⁺ DC are involved in the induction of TH1 responses (Maldonado-Lopez et al., 1999; Pulendran et al., 1999) as well as in the induction of tolerance (Belz et al., 2002) to peripheral self-antigen, it will be worth studying these mechanisms in mice carrying a DC-specific deletion of CCR7.

Our data provide ample evidence that CCR7 is essentially required for skin DC and LC migration into dermal lymphatics under inflammatory conditions, thus guiding them on their way to the draining LN. A CCR7-based mechanism is also effective in directing semimature skin DC and a subpopulation of LC under steady-state conditions to the skin-draining LN, cells that are thought to play a pivotal role in the maintenance of peripheral tolerance. Since CCR7^{-/-} mice are not prone to spontane-

ously develop autoimmune diseases, it seems likely that other mechanisms are able to compensate the impaired steady-state DC migration in the induction of peripheral tolerance. Alternatively it seems plausible that potentially autoreactive T cells present in CCR7-deficient mice are not efficiently activated, since naive T cells are also severely hampered from gaining entry into LN of CCR7^{-/-} mice, leading to impaired T cell-DC interaction.

In summary, our data identify CCR7 as a conductor within an orchestra of molecules directing the egress of DC from the skin under inflammatory and steady-state conditions.

Experimental Procedures

Mice

CCR7^{-/-} mice (mixed Balb/c × 129Sv/Ev genetic background) have been described earlier (Forster et al., 1999) and were used for the experiments shown in Figure 1G. For all other experiments, CCR7-deficient mice were used that had been backcrossed for seven generations to the C57BL/6 genetic background. Mice were maintained under SPF conditions and used at 8–12 weeks of age. All animals including germ-free Balb/c mice were maintained at the central animal facility of Hannover Medical School. The MHCII-restricted T cell receptor transgenic OT-II mice have been described earlier (Barnden et al., 1998).

Preparation of Epidermal Sheets and Fluorescent In Situ Staining of Skin DC

Epidermal sheets were obtained from ears of wild-type and CCR7^{-/-} mice as described earlier (Price et al., 1997). Briefly, ears were split into dorsal and ventral halves and floated split side down for 2 hr on 20 mM EDTA in PBS at 37°C. The epidermis was separated from the dermis with fine forceps, washed twice in PBS, and fixed in ice-cold acetone for 20 min at room temperature (RT). After rehydration in PBS, sheets were permeabilized in PBS containing 0.1% saponin (Sigma, Germany). After blocking with 5% mouse serum, sheets were stained with rat anti-mouse Langerin mAb (clone 929F3, kindly provided by Sam Saeland, Schering-Plough, France) followed by mouse anti-rat-Cy3 (Dianova, Germany). All staining and washing steps were performed in PBS supplemented with 0.1% saponin. Sheets were mounted with 17.5% Moviol (Calbiochem) in 25% glycerol and 100 mM Tris and images were made using an Axiovert 200M microscope and Axiovision 3.0 software (Carl Zeiss, Germany).

Skin Explant Culture and Staining of Emigrated Cells

As described elsewhere (Price et al., 1997), ears were split into dorsal and ventral halves and floated split side down on 1 ml medium containing RPMI, 10% FCS, and 50 μ M β -mercaptoethanol for 24 or 48 hr. Emigrated nonadherent cells were counted, washed in PBS/2%FCS, blocked with Fc-block reagent (CD16/CD32, BD Biosciences) for 20 min at 4°C, and stained with anti-I-A^b-PE and anti-CD86-FITC (BD Biosciences) to determine the number of emigrated DC from the skin.

In Vivo Activation of DC

The emigration of epidermal DC was induced in vivo by applying 50 μ l of 0.1% FITC in carrier solution (1:1 v/v acetone:dibutylphthalate) onto the right and left ear or by applying 100 μ l of the solution onto the shaved abdomen. Control animals received the same amount of carrier solution without FITC. The animals were sacrificed 18–24 hr later. For histological analysis, the ears were removed. For quantification of LC in the epidermis, epidermal sheets were prepared, stained, and analyzed as described above.

In Vitro Differentiation and In Vivo Migration of Bone Marrow DC

Bone marrow DC of wild-type and CCR7-deficient mice were generated based on a protocol developed by Lutz et al. (1999). In brief, 2 × 10⁶ bone marrow cells were cultivated for 7 days in RPMI supplemented with 100 ng/ml GM-CSF, 10% FCS, and 50 μ M

β -mercaptoethanol; one volume of fresh medium was added at day 3, and on day 6 one volume was replaced by fresh medium. GM-CSF was produced by a NIH-3T3 cell line infected with Psi2-pM5DGM#6 (Qin et al., 1997). On days 7 to 9, the culture medium was supplemented with 30 ng TNF/ml (R&D Systems) and 1 μ g/ml prostaglandin-E₂ (PGE₂, Sigma) to induce maturation. Analysis of cells obtained with this procedure revealed that >90% expressed CD11c with 50%–60% showing high levels of MHCII and in the case of wild-type donors these cells also expressed high levels of CCR7. For labeling cells with fluorescent dyes, 10⁷ cells/ml DC in HBSS/2%FCS were incubated with either 3 μ M CFSE or 10 μ M TAMRA (Molecular Probes) for 10 min at 37°C. A mixture of each 10⁶ CFSE- and TAMRA-labeled DC was injected in a volume of 30 μ l into the foot pad of wild-type recipients.

Flow Cytometry

To obtain single cell suspensions of LN and spleen, organs were minced through a nylon mesh and washed with PBS supplemented with 3% FCS and 5 mM EDTA. Erythrocytes of the spleen were removed by hypotonic lysis with NH₄Cl. Cells were stained with antibodies against MHCII, CD4, CD11c, CD40, CD80, CD86, V α 2, and V β 5.1-5.2 (Becton Dickinson) and CD8 α , CD69 (Caltag, Germany) as described earlier (Förster et al., 1994). CCR7 expression on LN or epidermal DC was detected by staining with rat-anti-mCCR7 (clone 4B12) that will be described elsewhere (U. Ritter et al., submitted). The specificity of this antibody has been confirmed in the present study by lack of staining on DC and T cells isolated from CCR7^{-/-} mice (data not shown). For the detection of Langerin (CD207) expression, cells were fixed with 1% paraformaldehyde for 10 min on ice, washed, and resuspended in 0.1% saponin (Sigma, Germany) in PBS containing 3% FCS for 15 min at RT. Cells were stained with anti-Langerin (clone 929F3) or an isotype control antibody. The anti-Langerin mAb was detected using mouse anti-rat-Cy5.

Isolation of Langerhans Cells from the Epidermis

Epidermal sheets of untreated mice were prepared as described above and cut into small pieces, which were digested with 0.1 mg/ml collagenase D (Roche) in PBS containing 10% FCS for 30 min at 37°C. The digested epidermal pieces were minced and filtered through a nylon mesh and LC were stained with anti-MHCII-FITC, anti-CD11c-biotin/streptavidin-PerCP, and anti-CCR7 or isotype control.

Monitoring of Antigen-Specific T Cell Proliferation Responses In Vivo

LN cells isolated from OT-II mice were labeled with CFSE as described elsewhere (Lyons and Parish, 1994). In brief, 10⁷ cells/ml were incubated in RPMI supplemented with 10% FCS, 25 mM HEPES (pH 7.4), and 5 μ M CFSE for 10 min. The frequency of V α 2/V β 5.1-5.2 CD4⁺ T cells was determined by flow cytometry. A total number 2 × 10⁶ V α 2⁺ V β 5.1-5.2⁺ CD4⁺ cells were transferred into recipient mice by i.v. injection. After 24 hr, mice were immunized s.c./i.d. in the ear and hind footpad with variable amounts of ovalbumin (0.1–10 μ g OVA, Grade VI, Sigma) and 10 μ g CpG1668 (TIB MolBio, Germany) and contralaterally with 10 μ g CpG alone. Mice were sacrificed 72 hr later. Antigen-specific V α 2⁺ V β 5.1-5.2⁺ CD4⁺ cells of the OVA draining and contralateral nondraining LN were analyzed for proliferation, which is indicated by the dilution of CFSE-fluorescence intensity.

To test the stimulatory capacity of skin DC under steady-state conditions, experiments were performed according to those described by Hawiger et al. (2001) and Bonifaz et al. (2002). OT-II cells were CFSE labeled and adoptively transferred as described above. Various amounts of LPS-free OVA (<5 EU/mg, prepared by filtration on Detoxyl columns [Pierce] and tested with LAL QCL-1000 [BioWhittaker-Cambrex] according to the manufacturer's instructions) were injected s.c./i.d. into the ear and hind footpad. In another set of experiments, ovalbumin was conjugated to an anti-CD205 mAb (clone NLDC145) as described previously (Bonifaz et al., 2002). Following adoptive transfer of OT-II cells, mice received 1 μ g anti-CD205:OVA conjugate in PBS s.c.

Acknowledgments

We thank Martin Lipp, MDC Berlin, for providing CCR7-deficient mice on a mixed 129Sv × Balb/c background. We are grateful to Sam Saeland, Schering-Plough, for providing the anti-Langerin antibody, to Eva Stuewe for excellent technical assistance, and to Oliver Pabst and Günther Bernhardt for valuable suggestions on the manuscript. We are also grateful to Sheila Fryk for critically reading the manuscript. Requests regarding the GM-CSF producing cell line should be sent to Thomas Blankenstein (tblank@mdc-berlin.de). This work has been supported by a DFG grant Fo 334/1-1 to R.F.

Received: February 6, 2004

Revised: June 15, 2004

Accepted: June 23, 2004

Published: August 17, 2004

References

- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565–568.
- Barker, J.N., Jones, M.L., Swenson, C.L., Sarma, V., Mitra, R.S., Ward, P.A., Johnson, K.J., Fantone, J.C., Dixit, V.M., and Nickoloff, B.J. (1991). Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. *J. Immunol.* 146, 1192–1197.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* 76, 34–40.
- Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Miller, J.F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J. Exp. Med.* 196, 1099–1104.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627–1638.
- Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., et al. (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400, 776–780.
- Cavanagh, L.L., and Von Andrian, U.H. (2002). Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 80, 448–462.
- Cyster, J.G. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286, 2098–2102.
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188, 373–386.
- Dieu-Nosjean, M.C., Massacrier, C., Homey, B., Vanbervliet, B., Pin, J.J., Vicari, A., Lebecque, S., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Zlotnik, A., and Caux, C. (2000). Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 192, 705–718.
- Flier, J., Boorsma, D.M., van Beek, P.J., Nieboer, C., Stoof, T.J., Willemze, R., and Tensen, C.P. (2001). Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J. Pathol.* 194, 398–405.
- Förster, R., Emrich, T., Kremmer, E., and Lipp, M. (1994). Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature recirculating B cells and a subset of T memory helper cells. *Blood* 84, 830–840.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23–33.
- Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T., and Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J. Exp. Med.* 189, 451–460.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194, 769–779.
- Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J.J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., et al. (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int. Immunol.* 13, 695–704.
- Hugues, S., Mougneau, E., Ferlin, W., Jeske, D., Hofman, P., Hofmann, D., Beaudoin, L., Schrike, C., Von Herrath, M., Lehuen, A., and Gleichmann, N. (2002). Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity* 16, 169–181.
- Katou, F., Ohtani, H., Nakayama, T., Ono, K., Matsushima, K., Saaristo, A., Nagura, H., Yoshie, O., and Motegi, K. (2001). Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* 158, 1263–1270.
- Larsen, C.P., Steinman, R.M., Witmer-Pack, M., Hankins, D.F., Morris, P.J., and Austyn, J.M. (1990). Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J. Exp. Med.* 172, 1483–1493.
- Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., and Cyster, J.G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12694–12699.
- Lutz, M.B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23, 445–449.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77–92.
- Lyons, A.B., and Parish, C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171, 131–137.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 587–592.
- Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U.E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J. Exp. Med.* 198, 615–621.
- Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* 3, 1135–1141.
- Nakano, H., and Gunn, M.D. (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, 361–369.
- Price, A.A., Cumberbatch, M., Kimber, I., and Ager, A. (1997). Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J. Exp. Med.* 186, 1725–1735.
- Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1036–1041.
- Qin, Z., Noffz, G., Mohaupt, M., and Blankenstein, T. (1997). Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with

- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J. Immunol.* **159**, 770–776.
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94–99.
- Ruedl, C., Koebel, P., Bachmann, M., Hess, M., and Karjalainen, K. (2000). Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J. Immunol.* **165**, 4910–4916.
- Saeki, H., Moore, A.M., Brown, M.J., and Hwang, S.T. (1999). Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J. Immunol.* **162**, 2472–2475.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2760–2769.
- Schuler, G., and Steinman, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* **161**, 526–546.
- Shortman, K., and Liu, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151–161.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonocchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* **161**, 1083–1086.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271–296.
- Stingl, G., Tamaki, K., and Katz, S.I. (1980). Origin and function of epidermal Langerhans cells. *Immunol. Rev.* **53**, 149–174.
- Stoitzner, P., Holzmann, S., McLellan, A.D., Ivarsson, L., Stossel, H., Kapp, M., Kammerer, U., Douillard, P., Kampgen, E., Koch, F., et al. (2003). Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 266–274.
- Vassileva, G., Soto, H., Zlotnik, A., Nakano, H., Kakiuchi, T., Hedrick, J.A., and Lira, S.A. (1999). The reduced expression of 6CKine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6CKine genes. *J. Exp. Med.* **190**, 1183–1188.
- Weinlich, G., Heine, M., Stossel, H., Zanella, M., Stoitzner, P., Ortner, U., Smolle, J., Koch, F., Sepp, N.T., Schuler, G., and Romani, N. (1998). Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 441–448.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* **102**, 2187–2194.
- Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., and Yamaguchi, Y. (1998). EB1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol.* **161**, 3096–3102.
- Yoshino, M., Yamazaki, H., Nakano, H., Kakiuchi, T., Ryoke, K., Kunisada, T., and Hayashi, S. (2003). Distinct antigen trafficking from skin in the steady and active states. *Int. Immunol.* **15**, 773–779.

Publikationsliste N. Czeloth

1) **Czeloth N**, Bernhardt G, Hofmann F, Genth H, Forster R.

Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells.

Journal of Immunology. 2005 Sep 1;175(5):2960-7.

2) **Czeloth N**, Schippers A, Muller W, Eilers B, Bernhardt G, Forster R.

Sphingosine 1-Phosphate Receptor signalling regulates Positioning of Dendritic Cells within the Spleen.

Journal of Immunology. Manuskript eingereicht. 2007.

3) Ohl L, Mohaupt M, **Czeloth N**, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Forster R.

CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions.

Immunity. 2004 Aug;21(2):279-88.

4) Meike Wendland, **Niklas Czeloth**, Nicolas Mach, Bernard Malissen, Elisabeth Kremmer, Oliver Pabst, Reinhold Förster.

CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine.

PNAS. 2007 April 10, 104(15): 6347-52.

5) Pabst O, Peters T, **Czeloth N**, Bernhardt G, Scharffetter-Kochanek K, Forster R.

Cutting edge: egress of newly generated plasma cells from peripheral lymph nodes depends on beta 2 integrin.

Journal of Immunology. 2005 Jun 15;174(12):7492-5.

6) Michael K. Maier, Sebastian Seth, **Niklas Czeloth**, Quan Qiu, Inga Ravens, Elisabeth Kremmer, Maria Ebel, Werner Müller, Oliver Pabst, Reinhold Förster, Günter Bernhardt.

The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens.

European Journal of Immunology. Manuskript akzeptiert.

7) **Czeloth N**, Seth S, Maier MK, Eilers B, Kremmer E, Bernhardt G, Forster R.

CD83 expression in the murine immune system. Manuskript in Vorbereitung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsleistung verwendet worden ist. Es wurde außerdem an keiner weiteren Hochschule ein Promotionsverfahren eröffnet.

Niklas Czeloth, Hannover den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Reinhold Förster und Dr. Günther Bernhardt für die Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation am Institut danken.

Ich danke weiterhin ganz herzlich Prof. Dr. Walter Müller für die Übernahme des Referates zu dieser Arbeit.

Ich danke Birgit Eilers für hervorragende technische Hilfe und Sebastian Seth und Klaus Maier für die Hilfe bei dem CD83-Projekt und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfe und Unterstützung.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, Heide und Eckhart Czeloth, die mich immer unterstützt haben.

Ich möchte auch Janine Meyer danken, die während dieser Arbeit für mich da war.

Ich widme diese Arbeit meinem Sohn Julian und meinem Großvater Dr. Herbert Garbe, der in mir das Interesse für die Wissenschaft geweckt hat.

Lebenslauf

Name: Niklas Czeloth

Geboren: 14.05.1976 in Kiel

Staatsangehörigkeit: deutsch.

Schulbildung:

1982-1986: Grundschule Rammsee

1986-1995: Max-Planck-Gymnasium Kiel
Abschluss: Abitur

Zivildienst:

1995-1996: Diakoniestation Residenz Waldwiese, Kiel

Universitäre Ausbildung:

1996-2002: Studium Biochemie
Universität Hannover
Abschluss: Diplom

Beruflicher Werdegang:

Seit 2003: Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Medizinische Hochschule Hannover
Institut für Immunologie